Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Prof. Dr. med. R.-E. Bader

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE UND HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN MIT HALBSYNTHETISCHEN PENICILLINEN UND AMINOGLYKOSIDEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dipl. Chem. Wilhelm Wurst
aus Herrenberg

1979

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Prof. Dr. med. R.-E. Bader

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE UND HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN MIT HALBSYNTHETISCHEN PENICILLINEN UND AMINOGLYKOSIDEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dipl. Chem. Wilhelm Wurst
aus Herrenberg

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. med. H.J. Mallach
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Ullmann
(Prof. Dr. med. R.-E. Bader
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. K.H. Niessen

Meiner Frau Elke

INHALTSVERZEICHNIS Seite

1. Einleitung
1.1 Allgemeine Problematik..... 1
1.2 Penicilline..... 2
1.3 Aminoglykoside..... 6
1.4 Kombination von Aminoglykosiden und Penicillinen..... 9
1.5 Aufgabenstellung..... 11

2. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen an Aminoglykosiden und Penicillinen
2.1 Dünnschichtchromatographie..... 12
2.2 Material und Methode
2.2.1 Harngewinnung, Aufbereitung und Konservierung..... 14
2.2.2 Verwendete Antibiotika..... 15
2.2.3 Dünnschichtchromatographie..... 16
2.2.4 Antimikrobielle Aktivität..... 16
2.2.5 Chemischer Nachweis..... 17
2.2.6 Verwandte Abkürzungen..... 17
2.3 Bisherige Untersuchungen zur Trennung und Differenzierung des Gentamicin-Komplexes.. 18
2.4 Ergebnisse und Diskussion der Untersuchungen der Aminoglykoside..... 20
2.5 Ergebnisse und Diskussion der Penicillin-untersuchungen..... 33

3. Hochdruckflüssigkeitschromatographische Untersuchungen an Penicillinen und Aminoglykosiden
3.1 Material und Methode
3.1.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie
3.1.1.1 Allgemeines..... 42
3.1.1.2 Aufbau eines Hochdruck-flüssigkeitschromatographen. 42

3.1.1.3 Verwandte Geräte..... 46
3.1.1.4 Stationäre Phase..... 46
3.1.1.5 Verwendete Säule..... 54
3.1.2 UV-Absorptionsspektren..... 54
3.1.3 Antibiotika-Lösungen und Konzentrationen..... 56
3.1.4 Eluenten..... 56
3.2 Bisherige Untersuchungen zur Auftrennung von Penicillinen..... 56
3.3 Eigene Untersuchungen zur Auftrennung von Penicillinen..... 57
3.4 Ergebnisse und Diskussion
3.4.1 Diskussion der Ergebnisse von Untersuchungen mit Lichrosorb SI 100 Säulen..... 58
3.4.2 Diskussion der Ergebnisse von Untersuchungen mit Lichrosorb RP 18 Säulen..... 62
3.5 Untersuchungen zum Nachweis und zur Auftrennung von Aminoglykosiden..... 77

4. Zusammenfassung
4.1 Dünnschichtchromatographie der Aminoglykoside..... 79
4.2 Dünnschichtchromatographie der Penicilline 79
4.3 Hochdruckflüssigkeitschromatographische Untersuchungen der Penicilline..... 80
4.4 Hochdruckflüssigkeitschromatographische Untersuchungen der Aminoglykoside..... 81

5. Literaturverzeichnis..... 82

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548922_0073

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Problematik

Die Intensivstation als "Mekka der Mikroben" - dieser Ausspruch des Bakteriologen Linzenmeier kennzeichnet die Problematik der heutigen Intensivmedizin. Vor wenigen Jahrzehnten war Staphylococcus aureus noch der wichtigste Problemkeim, heute übernehmen diesen Platz die Hospitalismuserreger Pseudomonas aeruginosa, Proteus- und Klebsiellaspecies. Am Beispiel der stark zunehmenden Sepsis durch Pseudomonas aeruginosa sei die Problematik etwas näher erläutert. Bei 25 - 30 % aller Krankenhauspatienten ist Pseudomonas aeruginosa im Stuhl nachzuweisen, als weiteres wichtiges Keimreservoir ist der Respirationstrakt anzusehen. May et al. (31) fanden in den Trachealabstrichen von 152 tracheotomierten Patienten in 64,5 % Pseudomonas aeruginosa. Bei Personen mit intakter körpereigener Abwehr pflegen Erkrankungen jedoch nur selten aufzutreten (13). Krankheitserreger wird Pseudomonas aeruginosa jedoch bei Patienten mit schweren Grunderkrankungen, vor allem hämatologischer, metabolischer und maligner Art. Disponiert sind weiterhin Patienten, die unter Cortikosteroiden oder Immunsuppressiva stehen, künstlich beatmete Patienten, Dauerkatheterträger, sowie Patienten mit ausgeprägten Verbrennungen. Für die pathogene Wirkung von Pseudomonas aeruginosa werden Endotoxine verantwortlich gemacht. Hierbei vor allem das Leukozidin, das für irreversible Schäden an Leukozyten verantwortlich ist.
Diese Entwicklung erklärt die starke Zunahme der Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Behandlung von Erkrankungen durch gramnegative Bakterien. Sie macht auch verständlich, daß in den letzten Jahren eine zunehmende Anzahl von Antibiotika eingeführt wurde, die in ihrer Wirkung vor allem gegen diese Bakterien gerichtet sind.

Ausgehend vom Penicillin G handelt es sich hierbei vor allem um die halbsynthetischen Penicilline Carbenicillin, Ticarcillin, Azlocillin und Mezlocillin; ferner ausgehend vom 1955 isolierten Kanamycin um die neueren Aminoglykoside Gentamicin, Tobramycin, Sisomicin und Amikacin.

1.2 Penicilline

Innerhalb der Breitspektrumpenicilline definierten Robinson und Sutherland (37) die pseudomonasaktiven Penicilline. Unter diesen semisynthetischen Substanzen ist das α-Carboxybenzylpenicillin = Carbenicillin (Abb. 2 b) das am längsten bekannte und bei weitem am besten erforschte Penicillin. 1964 wurde das Carbenicillin erstmalig synthetisiert, seine spezielle Pseudomonaswirksamkeit allerdings erst später erkannt (1).
Dem Einsatz von Carbenicillin folgte ein signifikanter Anstieg der Überlebensrate von Patienten mit Sepsis durch Pseudomonas aeruginosa (Abb. 1).

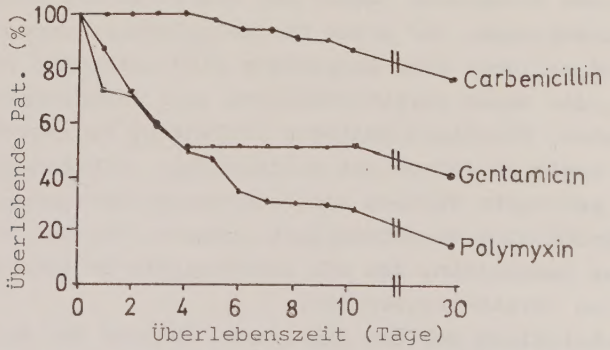
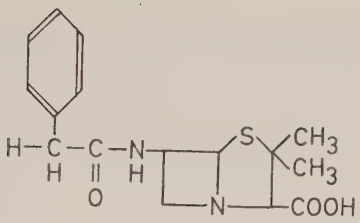
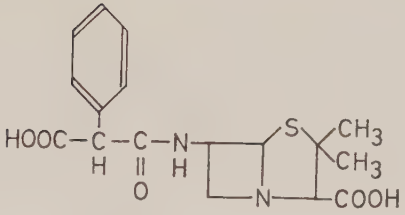


Abb. 1 : Einfluß einer Therapie mit verschiedenen in vitro gegenüber Pseudomonas aeruginosa wirksamen Antibiotika auf die Überlebensrate von Patienten mit Pseudomonas-Sepsis (8).

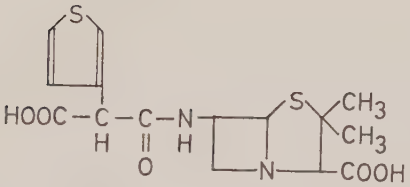
a)



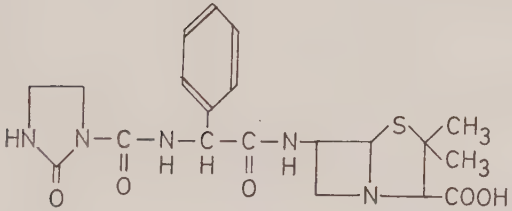
b)



c)



d)



e)

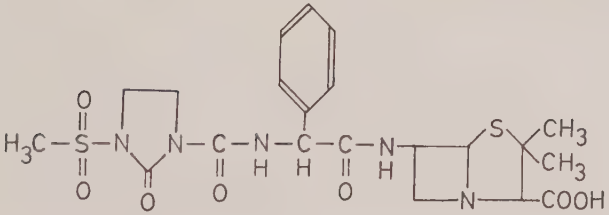


Abb. 2: Chemische Struktur von Penicillin G (a), Carbenicillin (b), Ticarcillin (c), Azlocillin (d) und Mezlocillin (e).

Das erst seit wenigen Jahren bekannte Ticarcillin, Azlocillin und Mezlocillin (Tab.2) stellten einen Fortschritt in der Therapie der oben genannten Hospitalismuserreger dar. Wie alle anderen Penicilline wirken sie über eine Hemmung der Zellwandsynthese der in der Wachstumsphase befindlichen Bakterien.

Jahr der Isolierung	Generic name	Handelsname z.B.
1964	Carbenicillin	Anabactyl^{R}
1970	Ticarcillin	Aerugipen^{R}
1974	Azlocillin	Securopen^{R}
1974	Mezlocillin	Baypen^{R}

Tab. 1

Alle Präparate sind sowohl gegen grampositive Erreger wie Staphylococcus aureus, Diplococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Corynebakterium diphteriae und Clostridiumspecies, als auch gegen die große Gruppe der gramnegativen Stäbchenbakterien wirksam, wobei sich Carbenicillin, Ticarcillin und Azlocillin durch eine besondere Aktivität gegen Pseudomonasspecies auszeichnen. Keines der vier Präparate sollte jedoch primär bei Erkrankung durch grampositive Erreger eingesetzt werden. Ebenso sollte bei Empfindlichkeit gegen Carbenicillin dieses eingesetzt werden, um eine schnellere Resistenzentwicklung gegenüber den wirksameren Präparaten vorzubeugen. Das Hauptanwendungsgebiet erstreckt sich auf Pseudomonas aeruginosa-Infektionen. Mehrere Autoren konnten bei Pseudomonas aeruginosa-Infektionen für Ticarcillin und Azlocillin eine gegenüber Carbenicillin mehrfach stärkere Wirkung nachweisen (Abb.3) (35,40).
Die Nebenwirkungen dieser Präparate entsprechen nicht ganz denen, die von anderen Penicillinen bekannt sind. So sind allergische Reaktionen deutlich geringer als bei Aminopenicillinen.

Ob bei diesen Substanzen wie unter Carbenicillintherapie vereinzelt hämorrhagische Diathesen auftreten, ist noch nicht bekannt. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß bei gelchromatographischer Auftrennung kommerzieller Carbenicillinlösung neben einer Fraktion mit antibakterieller Aktivität eine zweite isoliert werden konnte, die koagulationshemmende Wirkungen aufwies (3).

Da die Penicilline üblicherweise als Natriumsalze verabreicht werden, muß man bei der Therapie mit Carbenicillin und Ticarcillin, die als Di-Natriumsalze vorliegen, auf die beträchtliche Natriumbelastung achten, da 10 g Carbenicillin bereits 54,2 mval Natrium enthalten.

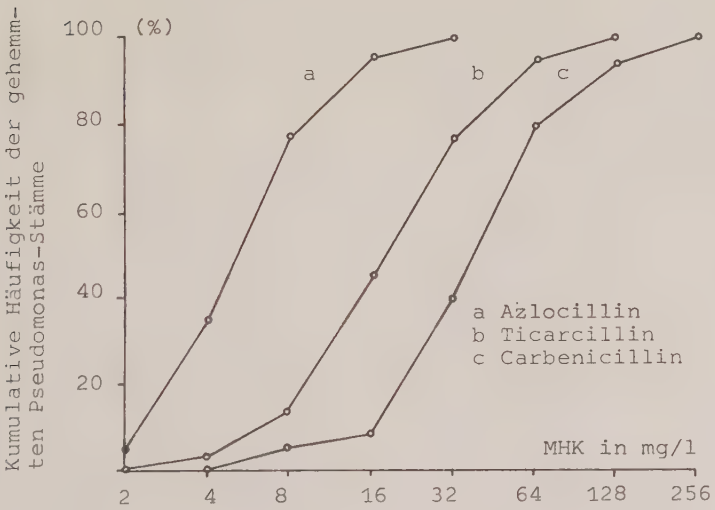


Abb. 3 : Aktivität von Azlocillin und Ticarcillin im Vergleich zu Carbenicillin gegenüber Pseudomonas aeruginosa (35,40).

1.3 Aminoglykoside

Die Aminoglykoside lassen sich in 2 größere Gruppen einteilen (Tab. 2), wobei für die erste aufgrund der starken Toxizität nur beschränkte Indikationen bestehen. Angehörige dieser Gruppe, sowie das Kanamycin, sollen daher in dieser Arbeit nicht näher betrachtet werden.

Jahr der Isolierung	Generic name	Handelsname z.B.
Aminoglykoside mit beschränkter Indikation		
1944	Streptomycin	Streptothenat^{R}
1947	Framycetin	Soframycin^{R}
1949	Neomycin A,B,C	Bykomycin^{R}
1952/61	Paramomycin	Humatin^{R}
1959	Aminosidin	Gabbromycin^{R}
1961	Spectinomycin	Stanilo^{R}
Aminoglykoside mit breiterer Indikation		
1955	Kanamycin	Kanamytrex^{R}
1963	Gentamicin	Refobacin^{R}
1967	Tobramycin	Gernebcin^{R}
1970	Sisomicin	Extramycin^{R}
1972	Amikacin	Biklin^{R}

Tab. 2

Das Wirkungsspektrum dieser neueren Aminoglykoside Gentamicin, Tobramycin, Sisomicin und Amikacin, deren Formeln aus Abbildung 4 ersichtlich sind, erstreckt sich auf folgende Mikroorganismen: Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Klebsiellaspecies, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Erwinia, indolpositive und -negative Proteusspecies, Pseudomonas aeruginosa, Brucellaceae, Mycoplasma pneumoniae und Providencia.

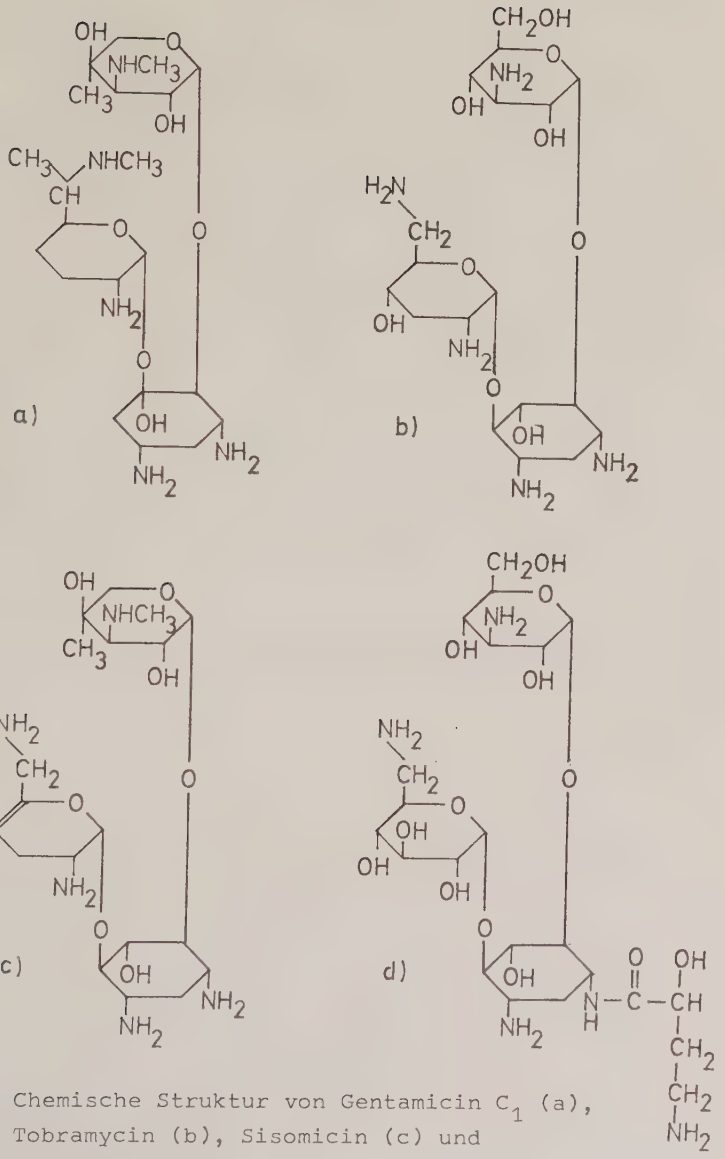


Abb.4: Chemische Struktur von Gentamicin C_1 (a), Tobramycin (b), Sisomicin (c) und Amikacin (d).

Die vergleichende antibakterielle Aktivität läßt sich etwa folgendermaßen charakterisieren:

1. Gegenüber Escherichia coli, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella- und Proteusspecies bestehen nur geringe Unterschiede der verschiedenen Derivate.
2. Gegenüber Serratia und Providencia ist Amikacin am aktivsten. Aufgrund seiner Stabilität gegenüber den meisten Aminoglykosid-inaktivierenden Enzymen findet es auch Anwendung gegen Klebsiella-Stämme mit kompletter oder weitgehender Resistenz gegen Gentamicin, Tobramycin und Sisomicin (33).
3. Gegenüber Pseudomonas aeruginosa erweist sich Tobramycin als aktivste Substanz.

Der Wirkungsmechanismus des dosisabhängigen bakteriziden Effekts von Gentamicin beruht auf einer Hemmung der Proteinsynthese, die an der Einbaurate verschiedener Aminosäuren gemessen wird. Jedoch wird auch wie bei anderen Aminoglykosiden der Einbau "falscher" Aminosäuren beschrieben.

Im Gegensatz zu den Penicillinen, die durch Hydrolyse des ß-lactam-Rings teilweise zur homologen Penicillansäure hydrolysiert werden, wird Gentamicin im Organismus nicht metabolisiert, sondern unverändert in mikrobiologisch aktiver Form zu 98 % über die Nieren ausgeschieden. Die Eliminationshalbwertszeit liegt bei Patienten mit normaler Nierenfunktion bei 1,8 - 2,4 h, so daß nach 6 - 8 h nur noch geringe Konzentrationen im Serum nachweisbar sind. Eine Kummulation ist also bei Dosierungsintervallen von 8 h und guter Nierenfunktion auszuschließen. Bei Patienten mit Niereninsuffizienz werden Halbwertszeiten von über 40 h gefunden. Wie wichtig diese Halbwertszeitzunahme ist, zeigt die hohe Toxizitätsrate bei Überdosierungen. So treten vor allem Schäden am Vestibularisorgan und an der Cochlea auf, die durch die stark verlängerte Halbwertszeit des Gentamicins in der Peri- und Endolymphe bedingt sind.

Die Zellschädigung wird durch eine Membranpermeabilitätsstörung verursacht, welche zu einer Störung der intracellulären Ionenkonzentration führt.
Die Nephrotoxizität wird mit 1 - 3 % angegeben. Diese Nebenwirkung ist besonders gefährlich, da sie selbst wiederum einen Anstieg der Serumkonzentration bedingt.
Im Gegensatz zur Kombinationstherapie mit Penicillinen (vgl. nächster Abschnitt) ist bei einer Kombination mit Cephalosporinen Vorsicht geboten. So gilt die Kombination mit Cephaloridin als Kunstfehler, da dabei die Nephrotoxizität deutlich erhöht wird.
Bei weit über der Norm liegenden Dosierungen kommt es im Tierversuch zum letalen Ausgang, der auf der Blockierung der neuromuskulären Übertragung durch Behinderung der Freisetzung des Acetylcholins beruht.
Es zeigt sich, daß alle toxischen Wirkungen an die freien Aminogruppen der Substanz gebunden sind, da nach Acetylierung der freien Aminoglykoside jegliche biologische Aktivität und Toxizität fehlen. Es spricht daher nichts dagegen, wenn die Ergebnisse der Gentamicinforschung sinngemäß auf die neueren Aminoglykoside übertragen werden. Die bisherigen klinischen Erkenntnisse bestätigen diese Annahme.

1.4 Kombination von Aminoglykosiden und Penicillinen

Über diese Kombinationstherapie wurde bereits sehr viel geschrieben; die Ansichten über den Therapieerfolg beziehungsweise über die in-vitro-Wirksamkeit sind nicht einheitlich. Nach Bodey (7) resultiere die Wirkung lediglich in einer Summation der Nephrotoxizität. Auch über eine Inaktivierung des Gentamicin durch Carbenicillin wird berichtet (32). Dies erfordert bei der Therapie eine streng getrennte Injektion. Durch zahlreiche Autoren konnte jedoch nachgewiesen werden, daß

die Wirksamkeit des Carbenicillin gegenüber Pseudomonas aeruginosa durch subinhibitorische Konzentrationen von Gentamicin im Sinne eines potenzierenden Synergismus gesteigert werden kann (37). In neueren Arbeiten konnte Ullmann durch biophotometrische Untersuchungen sowie mit Hilfe des Reihenverdünnungstestes eindeutige synergistische Wirkungen nachweisen, wobei sich das Ticarcillin in Kombination mit Tobramycin den anderen Kombinationen überlegen zeigte (Abb. 5) (44,45).

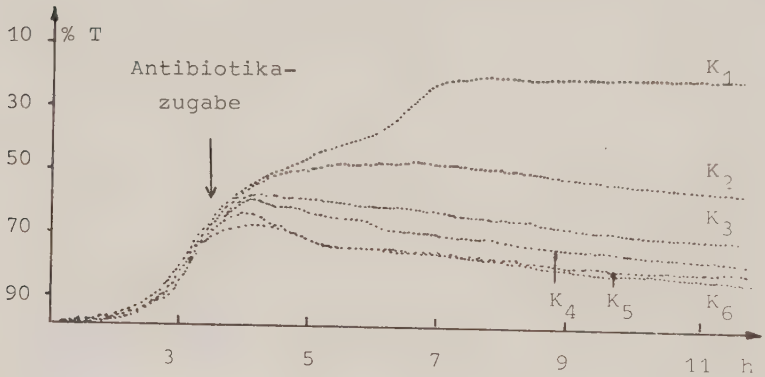


Abb. 5 : Wachstumskurve von Pseudomonas aeruginosa NCTC 10490 bei verschiedenen Antibiotikakonzentrationen. (45)

K_1 = Kontrolle
K_2 = 1,2 mg/l Gentamicin
K_3 = 1,2 mg/l Tobramycin
K_4 = 1,2 mg/l Tobramycin + 6,2 mg/l Ticarcillin
K_5 = 1,2 mg/l Tobramycin + 12,4 mg/l Ticarcillin
K_6 = 1,2 mg/l Tobramycin + 18,6 mg/l Ticarcillin

1.5 Aufgabenstellung

In Patientenurinen sollte der Nachweis folgender Antibiotika geführt werden.

Penicilline:	Carbenicillin
	Ticarcillin
	Azlocillin
Aminoglykoside:	Gentamicin
	Tobramycin
	Sisomicin
	Amikacin

Der Nachweis dieser Substanzen ist aus mehreren Gründen erforderlich. Bei Patienten, die mit unbekannten Antibiotika vorbehandelt wurden, können diese durch den Nachweis im Urin ermittelt werden. Da schwerkranke Patienten zunehmend mit mehreren Antibiotika behandelt werden, ist deren Unterscheidung in Körperflüssigkeiten wünschenswert, beispielsweise bei Spiegelbestimmungen. Weiterhin besteht ein Zusammenhang zwischen Urinspiegel und Toxizität. Dieser ist zwar nicht so aussagekräftig wie der zwischen Serumspiegel und Toxizität, jedoch ist der Nachweis von Antibiotika im Urin einfacher zu führen. Aus forensischen Gründen kann der Nachweis der Präparate im Urin notwendig werden, so zum Beispiel bei akutem Hörverlust unter Aminoglykosidtherapie, insbesonders bei niereninsuffizienten Patienten.
Die Präparate sollten mikrobiologisch nach Auftrennung des Urins nachgewiesen werden. Zur Auftrennung des Urins stand die Dünnschichtchromatographie zur Verfügung. Zum mikrobiologischen Nachweis diente die Bioautographie. Weiterhin sollten diese Präparate mittels der Hochdruckflüssigkeitschromatographie getrennt und ebenfalls der direkte Nachweis im Urin geführt werden. Hierfür stand ein modernes Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Gerät zur Verfügung.

2. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen an Aminoglykosiden und Penicillinen

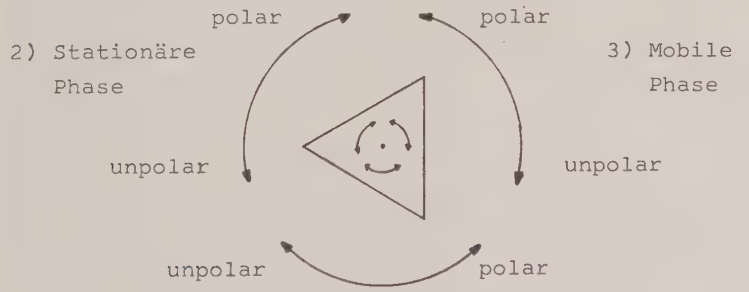
2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

"Tropfenchromatographische Analysenmethoden und Anwendung in der Pharmazie" ist der Titel der ersten Dünnschichtchromatographie-Publikation von Izmailov 1938 (21). Über Jahre hinweg wurde nur sporadisch über diese Analysenmethode berichtet, bis sie 1958 auf der ACHEMA vorgestellt und von der Industrie aufgegriffen wurde. Damit hatte der Siegeszug dieser einfachen Untersuchungsmethode begonnen und ist heute aus keinem noch so kleinen Labor mehr wegzudenken.
Während die anorganischen Sorptionsmittel wie Silicagel vorwiegend für die Trennung lipophiler Verbindungen verwendet werden, finden organische Sorptionsmittel - und hier vor allem die Cellulose und ihre Derivate - bei Trennung hydrophiler Substanzen wie Aminosäuren, Nucleinsäurederivate und Zuckern Anwendung. Durch die Aufbereitung der Cellulose wie Homogenisierung, wird die schnelle Substanzausbreitung entlang der langen Cellulosefasern wie bei der Papierchromatographie verhindert. Die Flecken werden kompakter und ermöglichen höhere Konzentrationen als bei der Papierchromatographie. Die hierfür geeigneten Fließmittel sind jedoch für die Dünnschichtchromatographie auf Celluloseschichten gleichfalls geeignet. Auf haftverbessernde Zusätze, Fluoreszensindikatoren und Cellulosederivate sei in diesem Rahmen nicht näher eingegangen.
Auf die Eigenschaften des Kieselgels oder richtiger des Silicagels wird bei der Besprechung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie näher eingegangen, da zwischen dem Trägermaterial SI 100 für Säulenchromatographie und Kieselgelfertigplatten keine prinzipiellen Unterschiede bestehen.
Zur Dokumentation der Dünnschichtchromatogramme wurden

die Platten nach der Entwicklung photographiert oder die Rf-Werte festgehalten.

$$Rf = \frac{\text{Entfernung des Fleckmittelpunkts vom Startpunkt}}{\text{Entfernung der Fließmittelfront vom Startpunkt}}$$

Auch bei genauer Registrierung aller experimenteller Daten sind die Rf-Werte nur Richtwerte für die Wanderungsweite, da schwer reproduzierbare Faktoren wie Schichtdicke, Kammersättigung, Luftfeuchtigkeit, Entmischungseffekte von zusammengesetzten Fließmitteln etc. einen beträchtlichen Einfluß ausüben (39). Da auch das Alter der Fließmittelgemische eine starke Auswirkung auf die Rf-Werte hat, mußten sie oft neu zubereitet werden.
Die Zusammenhänge der drei die Absorptionschromatographie beeinflussenden Größen
1) zu trennendes Gemisch,
2) stationäre Phase und
3) mobile Phase zeigt die Abbildung 6.
Richtet man die Spitze des Dreiecks auf eine der bekannten Größen, so zeigen die beiden anderen Spitzen die Veränderung der beiden davon abhängigen Größen.



1) Zu trennendes Gemisch

Abb. 6: Zusammenhänge zwischen zu trennendem Gemisch, stationärer Phase und mobiler Phase.

Hat man also einige sehr polare Substanzen aufzutrennen, so sollte man eine unpolare stationäre Phase und eine sehr polare mobile Phase verwenden.
Die Einflüsse der funktionellen Gruppen auf die Adsorptionsaffinität der Substanzen wird bei der Besprechung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie diskutiert. Ebenso wird dort ausführlich über die Stellung der Lösungsmittel innerhalb der eluotropen Reihe und ihrer daraus resultierenden Eigenschaften als Fließmittel diskutiert.

2.2 Material und Methode

2.2.1 Harngewinnung, Aufbereitung und Konservierung

Der untersuchte Harn stammte größtenteils von Patienten der Intensivstation der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen, teilweise von Patienten der Medizinischen Klinik. Da bei den meisten Patienten Dauerkatheter lagen, wurden die Proben aus folgenden Harnportionen entnommen:
Probe I : 2 + 3 h nach i.v.-Injektion oder Kurzinfusion
Probe II : 4 + 5 h nach i.v.-Injektion oder Kurzinfusion
Probe III: 6 + 7 h nach i.v.-Injektion oder Kurzinfusion
Die Zuverlässigkeit der Harnprobenentnahmen war gewährleistet, da der Verfasser sie während einer mehrwöchigen Tätigkeit auf den entsprechenden Stationen selbst vornahm.
Die Harnproben wurden sofort nach Entnahme in den Kühlschrank gestellt und noch am gleichen Tag weiterverarbeitet. Bei 3000 U/min wurden die Proben 10 min zentrifugiert, um ungelöste Bestandteile abzutrennen. Anschließend wurden 4 bis 6 Einzelportionen in sterile Glasröhrchen gegossen und bei -70°C bis zur endgültigen Verarbeitung eingefroren. Die Lagerung bei -70°C bewirkte keine Veränderung des biologischen Materials.

2.2.2 Verwendete Antibiotika

Gentamicin, Aktivität 620 µg/mg, Charge No.5863630 (Fa. Merck AG, Darmstadt). Bei der üblichen Dosierung von 3 x 80 mg und einer Ausscheidung von 79,3 % in 24 Stunden beziehungsweise 53 % in 6 Stunden (4) und einer angenommenen Harnmenge von 2 l entspricht dies einer ungefähren Urinkonzentration von 200 mg/l.
Tobramycin, Aktivität 95,5 %, Qa 179 J, Lot: L 11 115 F (Fa. Lilly GmbH, Gießen). In den ersten 3 Stunden werden bereits 25 %, und in den ersten 6 Stunden 60 % ausgeschieden, so daß die Harnspiegel etwa 3 Stunden nach Applikation mit 50 - 150 mg/l am höchsten sind, während sie bereits nach 6 Stunden unter 50 mg/l betragen.
Sisomicin, Aktivität 558 µg/mg, Pt 17 1316, (Fa.Schering Corp. USA und Fa. Bayer AG, Leverkusen). Die Harnspiegel betragen in den ersten 4 Stunden 20 - 140 mg/l.
Amikacin, Aktivität 888 µg/mg, Charge No.75 F 294 (Fa. Grünenthal, Stolberg). Über Harnspiegel liegen noch keine Literaturangaben vor.
Von diesen Aminoglykosidpräparaten wurden jeweils 40 g/l und 4 g/l H_2O eingewogen. Diese hohen Konzentrationen waren notwendig, um beim chemischen Nachweis mit der Ninhydrinreaktion gute Darstellungen zu erhalten.
Eine zweite Einwaage von 200 mg/l H_2O diente für den mikrobiologischen Nachweis, wie er auch mit Urinproben durchgeführt wurde.
Carbenicillin, Aktivität 97,7 %, Batch No. F 4009 (Fa. Beecham Research Lab.). Bei einer i.v. Gabe von 1 g betragen die Urinspiegel in der ersten Stunde bereits 2 g/l. Am Ende von Infusionen erreichen sie bis zu 20 g/l (4). Sowohl für die Untersuchung mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie als auch für dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden Lösungen mit Konzentrationen 1 g/l und 10 g/l H_2O hergestellt.

Ticarcillin, Aktivität 815 µg/mg, Charge No.B.R.L.2288 (Fa. Beecham Research Lab.). Bei i.v. Gabe von 5 g finden sich in den ersten 3 Stunden Urinspiegel bis zu 25 g/l Urin, nach 3 bis 6 Stunden bis zu 11 g/l.
Azlocillin, Aktivität 855 µg/mg, BAY e 6905, (Fa.Bayer AG, Leverkusen). Bei 2 g als i.v. Gabe betragen die Urinspiegel bis zu 11 g/l in der zweiten bis vierten Stunde. Bei Infusion von 5 g findet man im 0- bis 6-Stundenurin Konzentrationen bis zu 26 g/l Urin.
Mezlocillin, Aktivität 910 µg/mg, BAY f 1353, (Fa.Bayer AG, Leverkusen).
Penicillin G,Wertigkeit 1650 E/mg, Op.Nr. 61, (Fa. Hoechst AG, Frankfurt/M.).

2.2.3 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf DC-Alufolien (Fa. Merck AG, Darmstadt). Mit einer Mikropipette wurden Mengen zwischen 5 µl und 20 µl aufgetragen. Die Chromatographie wurde bei Kammersättigung und Zimmertemperatur durchgeführt. Die Entfernung Auftragepunkt - Fließmittelfront betrug 15 cm.

2.2.4 Antimikrobielle Aktivität

Die antimikrobielle Aktivität wurde mit der Bioautographie bestimmt. In Glaspetrischalen mit einem Durchmesser von 18 cm ließ man folgendes Nährmittel erstarren: Nährbouillon (Oxoid CM 67) bestehend aus 10 g Fleischextrakt, 10 g Pepton und 5 g NaCl unter Zugabe von 2,5 g Fadenagar auf 100 ml Aqua destillata, pH 7,2. Vor dem Gießen der Petrischalen wurden 100 ml heißem Agar (ca. 90°C) 2,5 ml standardisierte Sporensuspension zupipettiert.
Die getrockneten und nicht entwickelten Dünnschicht-

platten wurden kurze Zeit (5 bis 60 Sekunden) auf den Agar gelegt. Anschließend wurden die Petrischalen bei 37°C für mindestens 18 Stunden bebrütet. Die Aktivität ließ sich photographieren oder durch Ausmessen des Hemmhofdurchmessers protokollieren.
Zur Differenzierung der verschiedenen Aktivitäten bei den Penicillinen wurden die Agarplatten wie beschrieben hergestellt, anstelle der Sporensuspension wurden auf den gut getrockneten Platten

1. 0,5 ml einer standardisierten Suspension von Pseudomonas aeruginosa (Stamm ATCC 9721),
2. 0,5 ml einer standardisierten Suspension von Escherichia coli (Stamm ATCC 25922) und
3. 0,5 ml einer standardisierten Suspension von Staphylococcus aureus (Stamm ATCC 25923)

ausgespatelt.
Näheres über mikrobiologische Testverfahren ist in folgenden Literaturstellen nachzulesen (38,48).

2.2.5 Chemischer Nachweis

Zum chemischen Nachweis der verschiedenen Komplexe wurden die Chromatogramme mit Ninhydrin-Reagenz folgender Zusammensetzung besprüht: 0,3 g Ninhydrin wurden in 95 ml Äthanol gelöst und mit 5 ml 2-,4-,6-Collidin versetzt. Diese Mischung ist, im Kühlschrank aufbewahrt, über mehrere Wochen verwendbar. Der Zusatz von Collidin ist notwendig, da eine reine alkoholische Lösung von Ninhydrin mit Gentamicin keine Farbreaktion zeigt (46). Die besprühten Platten wurden für 10 Minuten bei 110°C entwickelt und anschließend photographiert.

2.2.6 Verwandte Abkürzungen

Um die Tabellen der verschiedenen Fließmittelzusammen-

setzungen übersichtlicher zu gestalten, wurden außer den chemischen Formeln folgende übliche Abkürzungen benützt.

1-Bu = 1-Butanol
n-Prop = n-Propanol
Pyr = Pyridin

2.3 Bisherige Untersuchungen zur Trennung und Differenzierung des Gentamicin-Komplexes

Bereits Maehr et al. (29) trennte das Gentamicin über eine Säule in verschiedene Fraktionen auf.

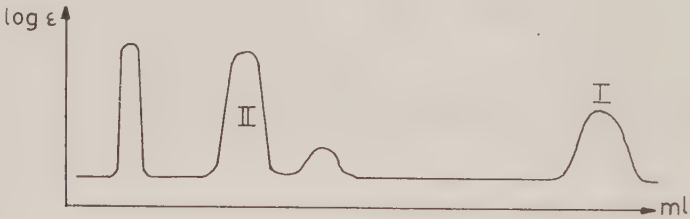
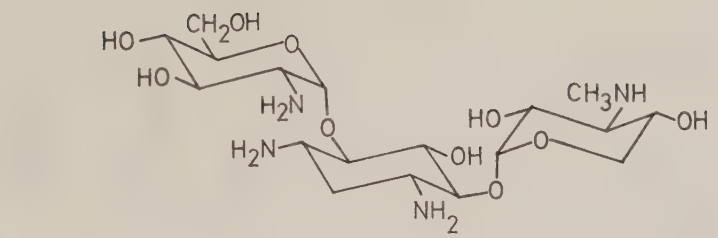
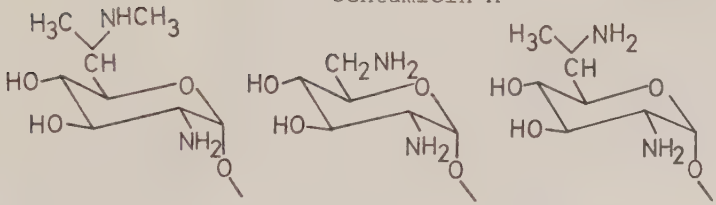


Abb. 7 : Fraktionierung des Gentamicin über eine Säule (Dowex 1-X2, 100-200 mash)

Der Peak I in Abbildung 7 konnte sehr bald als Gentamicin A charakterisiert werden. Seine Struktur und die der sogenannten C-Gentamicine zeigt Abbildung 8 in sterischer Anordnung.
Der Peak II enthielt die 3 Hauptkomponenten C_1, C_{1A} und C_2, die sich auf Silicagel G Platten mit dem Fließmittel Chloroform-Methanol-Ammoniak(17 %ig) im Verhältnis 50 : 25 : 25 vollständig auftrennen ließen (47). Die Entwicklungsdauer dieser Dünnschichtchromatogramme betrug jedoch 18 Stunden.



Gentamicin A



Gentamicin C_1 Gentamicin C_{1A} Gentamicin C_2

Abb. 8 : Sterische Struktur der Gentamicine A, C_1, C_{1A} und C_2

Eine Auftrennung in 7 Komponenten gelang Ullmann (46) auf Celluloseschichten mit dem Fließmittelgemisch 1-Butanol-Methanol-Eisessig-Wasser im Verhältnis 20 : 20 : 20 : 40. Durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie gelang eine noch bessere Trennung, wenn man die Platten zwischenzeitlich 24 Stunden trocknete. So ergab dieses zweidimensionale DC sieben Flecken, von denen 1 und 2 nicht deutlich getrennt waren und 5 nur aufgrund verschiedener Färbung bei der Ninhydrinreaktion als aus 2 Komponenten bestehend identifiziert werden konnte (Abb. 9).
Der Fleck 1 und 2, sowie der Fleck 5b zeigten deutliche antibakterielle Aktivität, während der Fleck 5a nur schwach antibakteriell wirksam war.

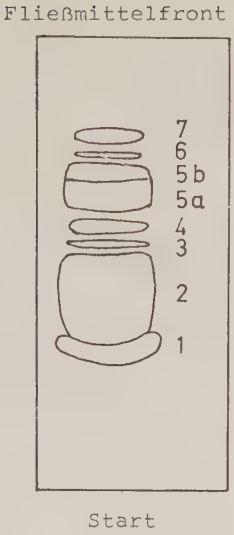


Abb. 9: Eindimensionales DC von 20 µl einer Gentamicinlösung 3 g/l auf Cellulose (46).

2.4 Ergebnisse und Diskussion der Untersuchungen der Aminoglykoside

In Anlehnung an die Arbeiten von Ullmann (46) wurde versucht, die vier Aminoglykoside Gentamicin, Sisomicin, Tobramycin und Amikacin zu trennen, beziehungsweise durch ihre Rf-Werte zu charakterisieren.
Während sich das Gentamicin wie oben beschrieben mit dem Fließmittel 1-Butanol-Methanol-Eisessig-Wasser im Verhältnis 20 : 20 : 20 : 40 gut auftrennen ließ, zeigten die anderen Aminoglykoside sowohl bei dem chemischen Nachweis als auch bei dem Bioautogramm eine deutliche Schwanzbildung (Abb. 10).

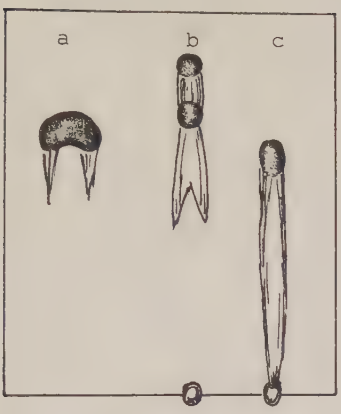


Abb. 10: Dünnschichtchromatogramm von Sisomicin (a), Tobramycin (b), und Amikacin (c). Chemischer Nachweis mittels Ninhydrin-Reaktion.

Aufgrund des chemischen Aufbaus der Aminoglykoside wurden noch folgende denkbaren Fließmittelgemische (41) getestet, die jedoch keinen nennenswerten Fortschritt ergaben. Auf die Darstellung der einzelnen Ergebnisse sei daher verzichtet.

1. 1-Bu - CH_3OH - CH_3COOH - H_2O	20 : 20 : 20 : 40
2. 1-Bu - CH_3COOH - H_2O	60 : 20 : 20
3. n-Prop - Pyr - CH_3COOH - H_2O	40 : 26 : 8 : 26
4. n-Prop - Pyr - CH_3OH - H_2O	40 : 26 : 8 : 26

Tab. 3 : Fließmittelgemische für Celluloseplatten, die sich zur Charakterisierung der Aminoglykoside als ungeeignet erwiesen.

Mehreren Autoren (29,47) gelang die Auftrennung des Gentamicins auf Kieselgelplatten mit verschiedenen Kombinationen des Gemisches Chloroform-Methanol-Ammoniak (17 %ig). So wurden von den in Tabelle 4 aufgeführten Fließmittelkombinationen vor allem die unter Nr. 6 bis 11 angeführten auf ihre Anwendung für alle Amino-

glykoside getestet.

1.	1-Bu - CH_3OH - CH_3COOH - H_2O	20 : 20 : 20 : 40
2.	1-Bu - CH_3COOH - H_2O	60 : 20 : 20
3.	1-Bu - Pyr - H_2O	50 : 25 : 25
4.	n-Prop - Pyr - CH_3COOH - H_2O	40 : 26 : 8 : 26
5.	n-Prop - Pyr - CH_3OH - H_2O	40 : 26 : 8 : 26
6.	$CHCl_3$ - CH_3OH - NH_3(17 %ig)	20 : 40 : 40
7.	$CHCl_3$ - CH_3OH - NH_3(17 %ig)	40 : 40 : 20
8.	$CHCl_3$ - CH_3OH - NH_3(17 %ig)	48 : 48 : 4
9.	$CHCl_3$ - CH_3OH - NH_3(17 %ig)	5 : 75 : 20
10.	$CHCl_3$ - CH_3OH - NH_3(17 %ig)	50 : 25 : 25
11.	$CHCl_3$ - CH_3OH - NH_3(17 %ig)	12 : 50 : 38

Tab. 4: Fließmittelgemische für Kieselgelplatten, mit denen eine Auftrennung der Aminoglykoside versucht wurde.

Die Kombination Nr. 10 Chloroform-Methanol-17 %iger Ammoniak im Verhältnis 50 : 25 : 25 ist ein Zweiphasengemisch und ermöglichte interessante Untersuchungen. Hiermit wurden folgende Chromatographieversuche unternommen:

1. Die obere Phase wurde in ein Becherglas gegeben. In dieses wurde ein Fließpapier so eingelegt, daß diese Phase im Fließpapier nach oben lief und zusammen mit der unteren Phase in die Dampfphase überging.
Die untere Phase wurde direkt in den Glasbehälter gegeben, der wie üblich mit Fließpapier ausgekleidet wurde. Somit bildete sich aus oberer und unterer Trennphase ein gesättigter Dampf, in dem die untere Phase überwog. Das Chromatogramm stand im Glasbehälter. Das Fließmittel war also die untere Phase. Mit der Ninhydrin-Reaktion ergaben sich 3 deutliche Banden mit sehr niedrigen Rf-Werten (Abb. 11 a).

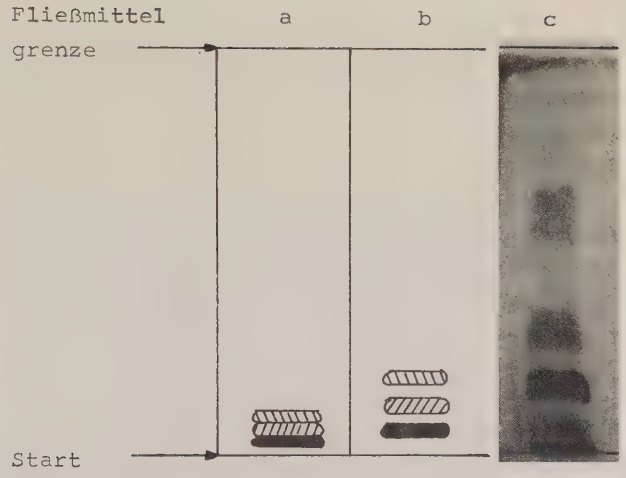


Abb. 11: Auftrennung des Gentamicin auf Kieselgelplatten.
Fließmittel: obere und untere Phase der unmischbaren Kombination Chloroform-Methanol-17 %iger Ammoniak 50 : 25 : 25.
Die Reihenfolge a, b, c, zeigt die veränderte Trennleistung bei zunehmender Dominanz der oberen Phase im gesättigten Dampf.

2. Die Anordnung war die gleiche wie bei Punkt 1, jedoch fehlte das Fließpapier im Behälter. Nur der "Fließpapierdocht" aus dem Becherglas trug zur Bildung einer gesättigten Dampfphase bei. Der Nachteil dieser Anordnung war, daß das Fließpapier sehr langsam bis an die 15 cm-Grenze lief.
Das Dünnschichtchromatogramm des Gentamicin bei dieser Anordnung zeigt Abbildung 11 b.
3. Hier wurde die Anordnung umgekehrt. Die obere Phase war im Glasbehälter und bildete durch das Eintauchen von Fließpapier allein die gesättigte Dampfphase.

Die untere, sogenannte langsame Phase, war im Becherglas, in welchem das Chromatogramm stand.
Der Nachteil war, wie schon Wagman (47) erwähnte, die lange Laufzeit von 10 bis 12 Stunden. Während Wagmann über die Auftrennung in 3 Komponenten berichtete, gelang hier mittels Ninhydrin-Reaktion der Nachweis von 7 Komponenten (Abb. 11 c). Die drei anderen Aminoglykoside ließen sich mit dieser Methode nicht gut charakterisieren, da sie fast vollständig am Auftragspunkt liegenblieben (Abb. 12).

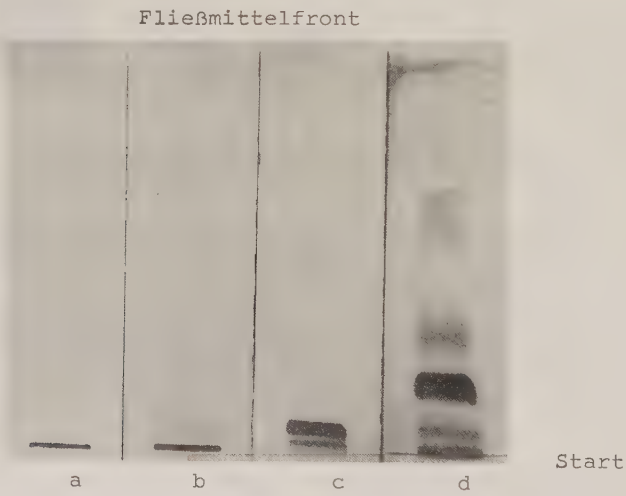


Abb. 12: Dünnschichtchromatogramm von Amikacin (a), Tobramycin (b), Sisomicin (c) und Gentamicin (d). Fließmittel ist das Zweiphasengemisch Chloroform-Methanol-17 %iger Ammoniak 50 : 25 : 25.

Die Fließmittelkombination Nr. 11 Chloroform-Methanol-17 %iger Ammoniak im Verhältnis 12 : 50 : 38 hingegen ergab zwar keine gute Auftrennung des Gentamicin, die Rf-Werte des Sisomicin, Tobramycin und Amikacin waren jedoch so unterschiedlich, daß dieses Laufmittelge-

misch eine gute Unterscheidungsmöglichkeit der Aminoglykoside mittels Dünnschichtchromatographie erlaubte (Abb. 13).

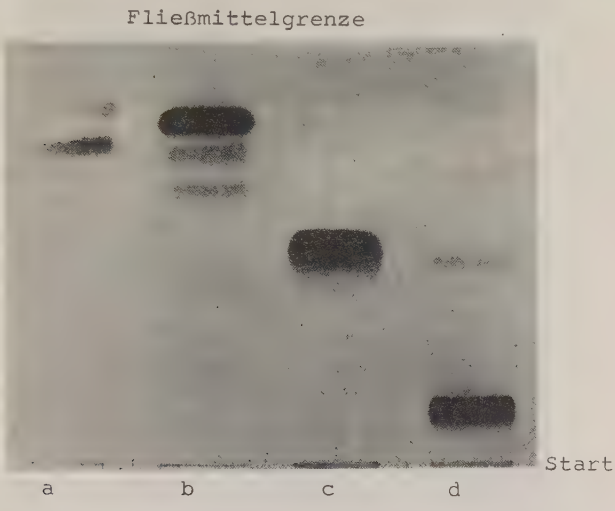


Abb. 13: Gentamicin (a), Sisomicin (b), Tobramycin (c) und Amikacin (d) auf Cellulose.
Fließmittel: Chloroform-Methanol-17 %iger Ammoniak im Verhältnis 12 : 50 : 38.

Beim Versuch, die Ninhydrin-positiven Flecken mittels des Bioautogramms als Hemmhöfe darzustellen, mußte jedoch festgestellt werden, daß es fast unmöglich war, von Kieselgel irgendwelche antibakteriellen Aktivitäten auf die mit Bacillus subtilis beimpften Agarplatten zu übertragen. Erst bei hohen Konzentrationen und langen Auflegezeiten des vorher mit Wasserdampf ausgiebig befeuchteten Chromatogramms ergaben sich Hemmzonen (Abb. 14).

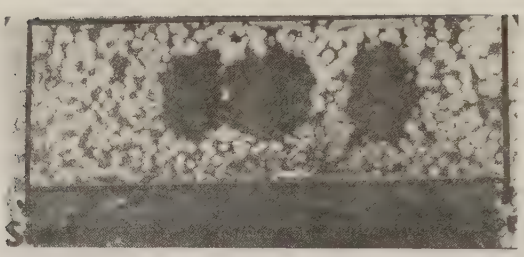


Abb. 14: Antibiogramm von Gentamicin (50 µl einer Lösung 10 g/l). Fließmittel wie Abbildung 13. Das mit Wasserdampf befeuchtete Chromatogramm lag 1 Stunde auf dem Agar.

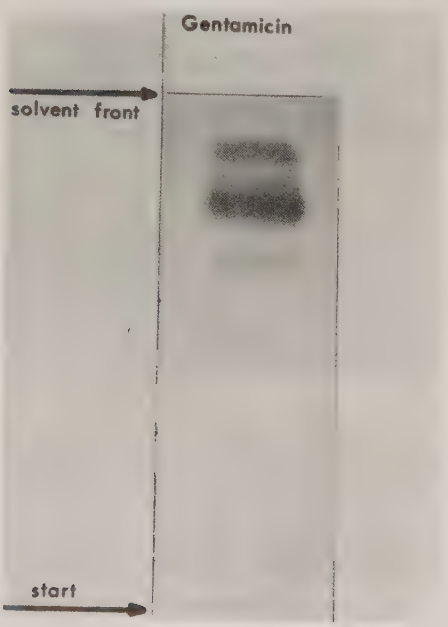


Abb. 15: 20 µl Gentamicin (4 g/l) auf Cellulose. Nachweis mittels Ninhydrin-Reaktion. Fließmittel wie Abbildung 13.

Da sich die Celluloseplatten für die Bioautographie sehr gut eigneten, wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Kombinationen Chloroform-Methanol-Ammoniak mit Celluloseplatten auf ihre Trennleistung getestet. Wiederum mit der Kombination Nr. 11 Chloroform-Methanol-17%iger Ammoniak im Verhältnis 12 : 50 : 38 fand sich ein Gemisch, das Gentamicin in 5 nachweisbare Substanzen auftrennte (Abb. 15) und das für Tobramycin, Sisomicin und Amikacin eine gute Darstellung ohne Schwanzbildung ermöglichte (Abb. 16)

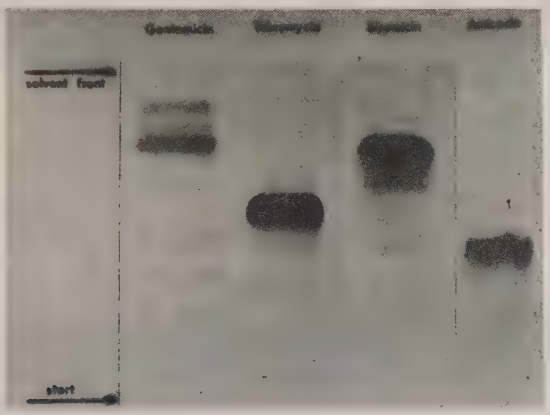


Abb. 16: Je 20 µl einer Lösung 4 g/l Wasser auf Cellulose. Nachweis mittels Ninhydrin-Reaktion.
Fließmittel: Chloroform-Methanol-17%iger Ammoniak im Verhältnis 12 : 50 : 38.

Auch mit dem Bioautogramm waren diese Ergebnisse gut zu verifizieren. Das Gentamicin bildete bei entsprechend niedriger Konzentration drei eindeutig erkennbare Hemmzonen, so daß die drei Hauptkomponenten des Gentamicin auch mikrobiologisch nachzuweisen waren (Abb. 17)

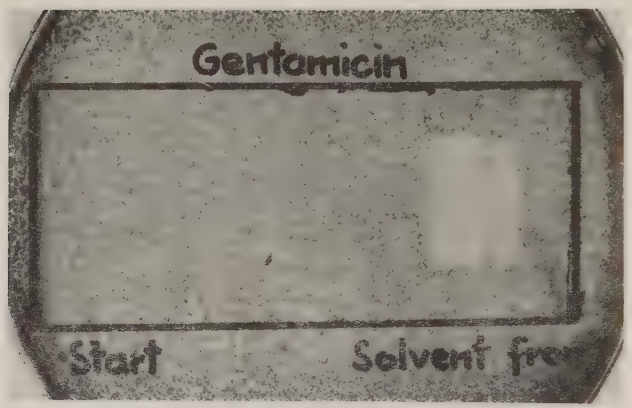


Abb. 17: Aufgetragen wurden 10 µl Gentamicinlösung 200 mg/l. Fließmittel: Chloroform-Methanol-17%iger Ammoniak 12 : 50 : 38.
Das Dünnschichtchromatogramm lag 1o Sekunden auf dem Agar auf.

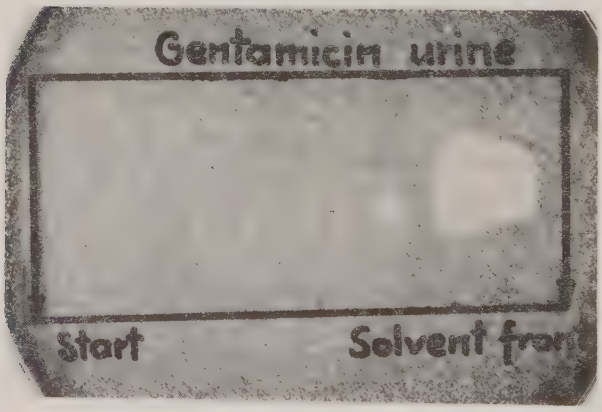
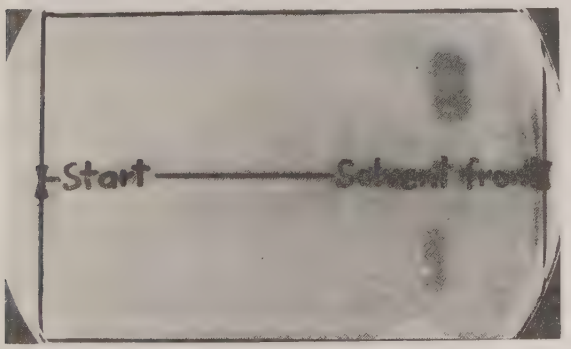


Abb. 18: Aufgetragen wurden 10 µl eines 4 Stunden nach Therapiebeginn abgenommenen Urins.
(Therapie: 3x40 mg Gentamicin (Refobacin^{R}))
Fließmittel und Auflegezeit wie Abbildung 17.

Zwar waren beim Nachweis des Gentamicin in verschiedenen Urinen die Rf-Werte der Hemmhöfe regelmäßig reproduzierbar, jedoch erreichte man weder durch noch so vorsichtiges Auftragen der Probe auf die Platten noch durch Variation der Konzentration oder Auflegezeit der Platten auf den Agar eine Auftrennung in getrennte Hemmzonen. Die Urinbestandteile bewirken offensichtlich eine gewisse Verschmierung bei der Trennung.
Die folgenden Abbildungen zeigen entsprechende Ergebnisse mit Tobramycin, Sisomicin und Amikacin. Sie entsprechen vollkommen denen der mit eingewogenen Substanzen erhaltenen Ergebnisse.
Keinerlei Aktivität fand man bei den Stellen, die außer dem Hauptbestandteil noch ninhydrinpositiv waren und sich auf dem Dünnschichtchromatogramm deutlich nachweisen ließen (Abb. 16). Ob es sich hierbei um antibiotisch unwirksame Substanzen handelt, oder ob sie in zu schwacher Konzentration vorlagen, ließ sich nicht entscheiden, da durch Erhöhung der Konzentration der Hemmhof des Hauptbestandteils so groß wurde, daß er die relativ nah gelegenen Hemmhöfe der anderen Komponenten überdeckte.



a) Sisomicin

b) Sisomicin-urin

Abb. 19: a) Aufgetragen wurden 10 µl Sisomicinlösung 200 mg/l Wasser.
b) 10 µl Urin eines Patienten, der mit 3 x 75 g Sisomicin (Extramycin^{R}) behandelt wurde.

Der Urin war 4 Stunden nach der i.v. Gabe aus dem Katheter entnommen.
Fließmittel und Auflegezeit wie bei Gentamicin (Abb. 17).

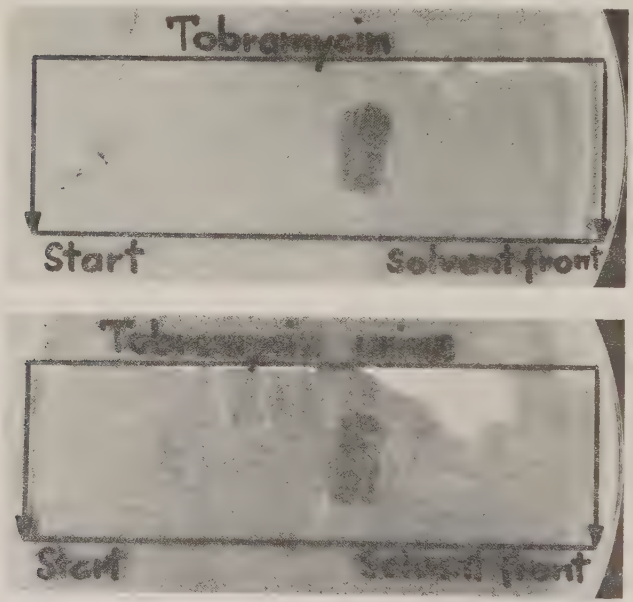
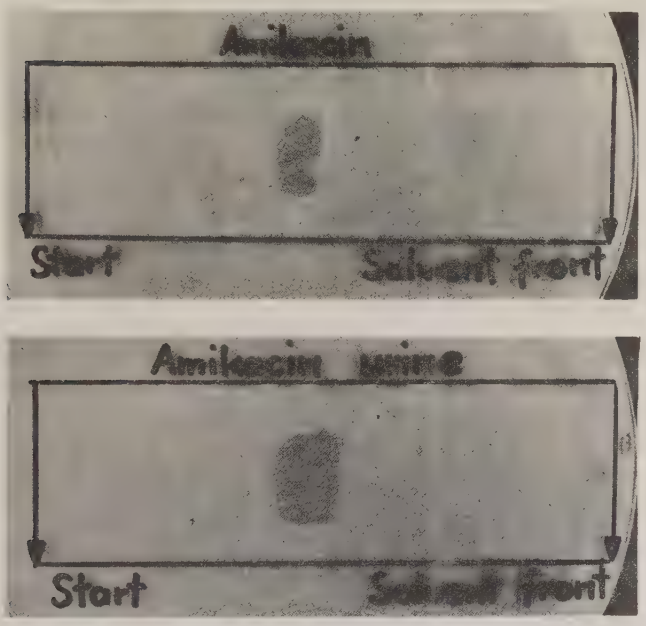


Abb. 20: a) Aufgetragen wurden 10 µl einer Tobramycinlösung 200 mg/l.
b) 10 µl eines Patienten, der mit 3 x 80 mg Tobramycin (Gernebcin^{R}) und 2 x 10 g Ampicillin (Binotal^{R}) behandelt wurde.$^{+)}$

$^{+)}$Werden Patienten zusätzlich zu einem Aminoglykosid mit Penicillinen behandelt, so können letztere durch ß-Laktamasebehandlung unwirksam gemacht werden. Eine eigene Untersuchung ergab jedoch, daß zumindest die Penicilline Penicillin G, Carbenicillin, Ticarcillin, Azlocillin und Mezlocillin bereits durch das stark basische Fließmittel (pH > 10), in dem die Aminoglykoside getrennt werden, vollständig inaktiviert werden.

Die Dünnschichtchromatogramme dieser Penicilline mit Konzentrationen von 10 g/l (dies ist die 10-fach höhere Dosis, als für den optimalen Nachweis notwendig) zeigten keinerlei Aktivität im Bioautogramm (vergleiche Abschnitt Nr. 2.5)



a)

b)

Abb. 21: a) Aufgetragen wurden 10 µl einer Amikacinlösung 200 mg/l.
b) 10 µl Urin eines Patienten, der mit 3 x 250 mg Amikacin (Biklin^{R}) behandelt wurde. Steriler Katheterurin 4 Stunden nach i.v. Kurzinfusion des Biklins.
Fließmittel und Auflegezeit siehe Gentamicin (Abb. 17)

Abschließend sind tabellarisch die Ergebnisse der Rf-Werte zusammengefaßt.

Antibiotikum	Rf-Werte bei		
	chemischem	mikrobiologischem	
	Nachweis mit Ninhydrin	Nachweis in wässriger Lösung	Nachweis in Urin
Gentamicin	0,78 0,83 0,89	0,75 0,80 0,88	0,86
Sisomicin	0,76	0,82	0,78
Tobramycin	0,57	0,58	0,58
Amikacin	0,43	0,46	0,46

Tab. 5: Rf-Werte der Aminoglykoside auf Kieselgel. Auftrennung mit dem Fließmittel Chloroform-Methanol-17%iger Ammoniak im Verhältnis 12 : 50 : 38

2.5 Ergebnisse und Diskussion der Penicillin-untersuchungen

Da im hiesigen Arbeitskreis bereits dünnschichtchromatographische Untersuchungen über einige Penicilline vorhanden waren und in Form von n-Propanol-Äthanol-Essigsäureäthylester-Wasser im Verhältnis 60 : 48 : 36 : 40 ein geeignetes Fließmittel vorlag, wurde dieses für die eigenen dünnschichtchromatographischen Untersuchungen übernommen.
Das Penicillin G als Referenzpräparat bot bei der Auftrennung und mikrobiologischen Darstellung keine Schwierigkeiten. Die Abbildung 22 zeigt das Bioautogramm des Penicillin G.
Auch Mezlocillin stellte sich sowohl in wässriger Lösung als auch in Urin als einheitliche Substanz dar, so daß anzunehmen ist, daß eine antibiotisch aktive Substanz vorlag. Dies bedeutet nicht, daß im Urin keine mikrobiologisch inaktiven Metaboliten vorlagen (Abb. 23).

Abb.22: 10 µl Penicillin G (1g/l) Auflegezeit 30 Sekunden

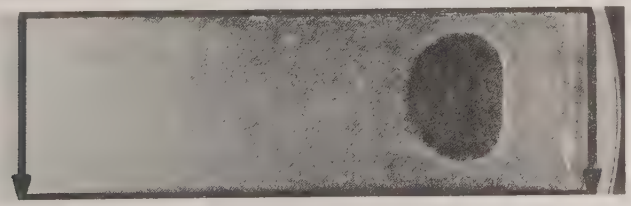


Abb.23: 10 µl Mezlocillin (1g/l) Auflegezeit 30 Sekunden

Anders waren die Verhältnisse bei Carbenicillin. In mehreren Versuchen zeigte sich, daß das Präparat bereits in der zu verabreichenden Lösung als Gemisch von zwei mikrobiologisch aktiven Substanzen vorliegt (Abb. 24 a). Auch im Urin fanden sich beide Komponenten in etwa gleicher Konzentration wieder (Abb. 24 b). Aufgrund des Rf-Wertes der der Fließmittelfront näher liegenden Hemmzone muß angenommen werden, daß es sich hierbei um Penicillin G handelte. Der Beweis ließ sich mit Agarplatten führen, auf denen Pseudomonas aeruginosa aufgespatelt war. Nur das gegen Pseudomonas wirksame Carbenicillin bildete einen Hemmhof (Abb. 24 e).
An dieser Bilderfolge lassen sich noch weitere Ergebnisse diskutieren, die die Charakterisierung der Penicilline durch Rf-Werte etwas in Frage stellen. In Abbildung 24 a wurden 10 µl einer Carbenicillinlösung (1g/l) aufgetragen. Als Urinprobe diente Zweistundenurin eines Patienten, der mit 2 x 5 g Carbenicillin (Anabactyl^{R}) behandelt wurde. Hiervon wurde 1 µl aufgetragen (Abb. 24 b). Die Rf-Werte dieser beiden Proben sind als praktisch identisch anzusehen. Im zweiten Bild wurden wieder 10 µl eingewogene Substanz aufgetragen, während jetzt 10 µl Urin desselben Patienten auf die Dünnschichtplatte pipettiert wurden (Abb. 24 d). Es zeigt sich, obwohl die eingewogene Substanz etwas schneller mit dem Fließmittel gelaufen ist, daß sich die Urinaktivität bei Zunahme der Konzentration anders verhält. Der dem Penicillin zugeordnete Hemmhof liegt etwas näher bei der Fließmittelfront, und der dem Carbenicillin zugeordnete ist mit seiner größten Aktivität zum Start hin wesentlich verlangsamt. Abbildung 25 e zeigt die biologische Aktivität gegenüber Pseudomonas aeruginosa. Auf die Agarplatte wurde eine halbe Stunde vor Auflegen der Chromatogramme eine standardisierte Suspension von Pseudomonas aeruginosa (Stamm ATCC 9721) aufgespatelt. Um überhaupt eine Aktivität zu finden, mußten 10 µl des gleichen Urins

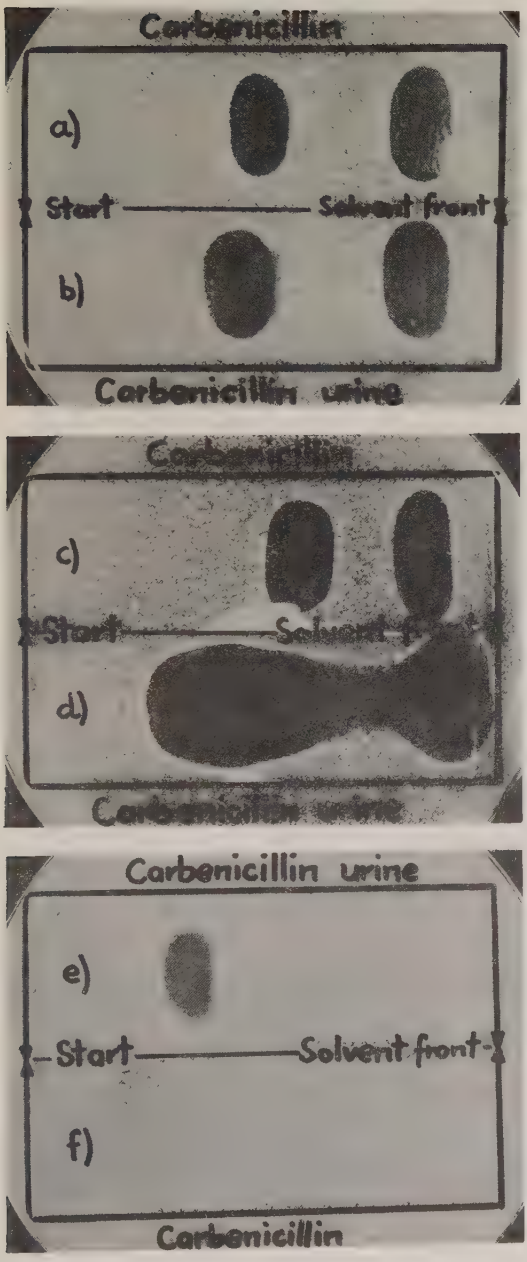


Abb. 24:
Auftrennung von Carbenicillin in wässriger Lösung sowie Darstellung der antibakteriellen Aktivität mit der Bioautographie.

a) 10 µl Carbenicillinlösung (1g/l)

b) 1 µl Zweistundenurin (Therapie: 2x5 g Carbenicillin (Anabyctyl^{R}))

c) wie a)

d) 10 µl Zweistundenurin

e) 10 µl Zweistundenurin (Pseudomonas aeruginosa-Platte)

f) 10 µl Carbenicillinlösung (1g/l)

chromatographiert werden. Die Rf-Werte in Abbildung 24 d und e, bei denen jeweils 10 µl Urin aufgetragen wurden, entsprechen sich annähernd. Der Rf-Wert des Carbenicillins im Urin scheint also mit zunehmender Konzentration der Urinbestandteile kleiner zu werden. Sehr deutlich jedoch ist aus Abbildung 24 e zu erkennen, daß nur die langsamere Komponente dem Pseudomonas-wirksamen Carbenicillin entspricht. Ebenfalls läßt sich erkennen, daß zur Hemmung von Pseudomonas aeruginosa hohe Konzentrationen an Carbenicillin notwendig waren, da der Hemmhof der Urinprobe (Abb. 24 e) wesentlich kleiner ist als in Abbildung 24 d und eine Einwaage von 1 g/l Carbenicillin keine Wachstumshemmung mehr bewirkte (Abb. 24 f). Erst bei 10 µl einer Konzentration von 10 g/l entsprach die Größe des Hemmhofs demjenigen von Abbildung 24 e. Hieraus kann der Schluß gezogen werden, daß die Carbenicillin-Konzentration im Patientenurin etwa 1o g/l betrug.

Aufgrund der physikalisch-chemischen Ähnlichkeit des Benzolrings mit dem des Thiophen ergaben sich für Ticarcillin sehr ähnliche Ergebnisse (Abb. 25). Hier war die Abhängigkeit der Rf-Werte von der Urinkonzentration noch ausgeprägter. Anhand der Bilderfolge dieser Untersuchung sei dies verdeutlicht.

In Abbildung 25 a wurden 10 µl Ticarcillin (1g/l) aufgetragen. In Abbildung 25 b waren es 10 µl des Zweistundenurins eines Patienten, der mit 3x5 g Ticarcillin behandelt wurde. In Abbildung 25 c und d waren es jeweils 20 µl Lösung. Die unterschiedlichen Rf-Werte in wässriger Lösung und in Urin sind deutlich und in beiden Versuchen etwa gleich. In Abbildung 25 e und f wurden 10 µl Urin des oben genannten Patienten und 10 µl einer Lösung (1 g/l) aufgetragen. Auch hier wurde auf der mit Pseudomonas aeruginosa bespatelten Platte das Wachstum der Bakterien nur an einer Stelle gehemmt. Dieser Hemmhof entspricht dem pseudomonasaktiven Ticar-

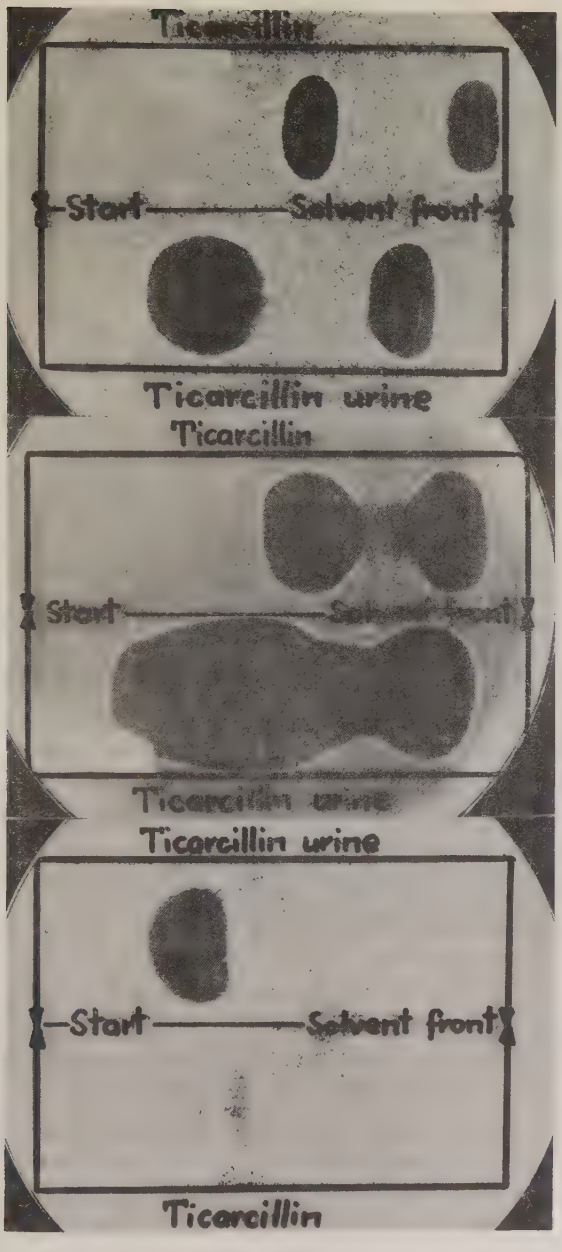


Abb. 25:

Auftrennung von Ticarcillin in wässriger Lösung und Darstellung der antibakteriellen Aktivität mit der Bioautographie.

a) 10 µl Ticarcillinlösung (1 g/l)

b) 10 µl Zweistundenurin (Therapie: 3x5 g Ticarcillin (Aerugipen^{R}))

c) 20 µl Ticarcillinlösung (1 g/l)

d) 20 µl Zweistundenurin

e) 10 µl Zweistundenurin (Platte mit Pseudomonas aeruginosa)

f) 10 µl Ticarcillinlösung (1 g/l)

cillin. Die inaktive Komponente entsprach dem durch CO_2-Abspaltung entstandenen "Penicillin G-Äquivalent" mit einem Thiophenring.
Im Gegensatz zum Carbenicillin erhielt man mit 10 µl einer Konzentration von 1 g/l bereits einen leichten Hemmhof (Abb. 25 f), was die stärkere Wirkung des Ticarcillins gegenüber Pseudomonas aeruginosa unterstreicht.
Nicht ganz so einfach war das Chromatogramm des Azlocillin zu deuten. Wie sich mehrfach zeigen ließ, bestand bereits die frisch angesetzte Lösung von 1 g/l aus drei antibakteriell aktiven Komponenten (Abb. 26 a). Die am schnellsten laufende Komponente trat jedoch erst beim Auftragen von 20 µl Lösung (1 g/l) auf. Bei 10 µl zeigten sich nur zwei Hemmzonen. Diese dritte Komponente war also entweder in sehr geringer Konzentration vorhanden, oder es handelte sich um eine nur schwach antibiotisch wirksame Komponente. Im Zweistundenurin eines mit 3 x 5 g Azlocillin (Securopen^R) behandelten Patienten fanden sich jedoch nur zwei aktive Komponenten.(Abb.26b) Aufgetragen wurden 5 µl Urin. Auch bei Erhöhung auf 10 µl stellte sich keine Hemmzone dar. Allerdings verschmolzen die beiden schon vorhandenen Zonen.
Während bei Carbenicillin und Ticarcillin jeweils die langsame Komponente die eigentlich pseudomonasaktive Substanz war, war es hier die mittlere Komponente, wie sich aus der Übereinstimmung des Rf-Werts ergab (Abb.27), wenn Pseudomonas aeruginosa als Testmikroorganismus verwendet wurde. Wurden die Dünnschichtplatten mit Escherichia coli entwickelt, ergab sich ein Hemmhof, der hinsichtlich des Rf-Werts mit der Pseudomonas aeruginosa-aktiven Komponente übereinstimmte. Wurde Staphylococcus aureus als Testbakterium verwendet, so zeigte sich, daß beide Komponenten gegen Staphylococcus aureus wirkten (Abb. 28).

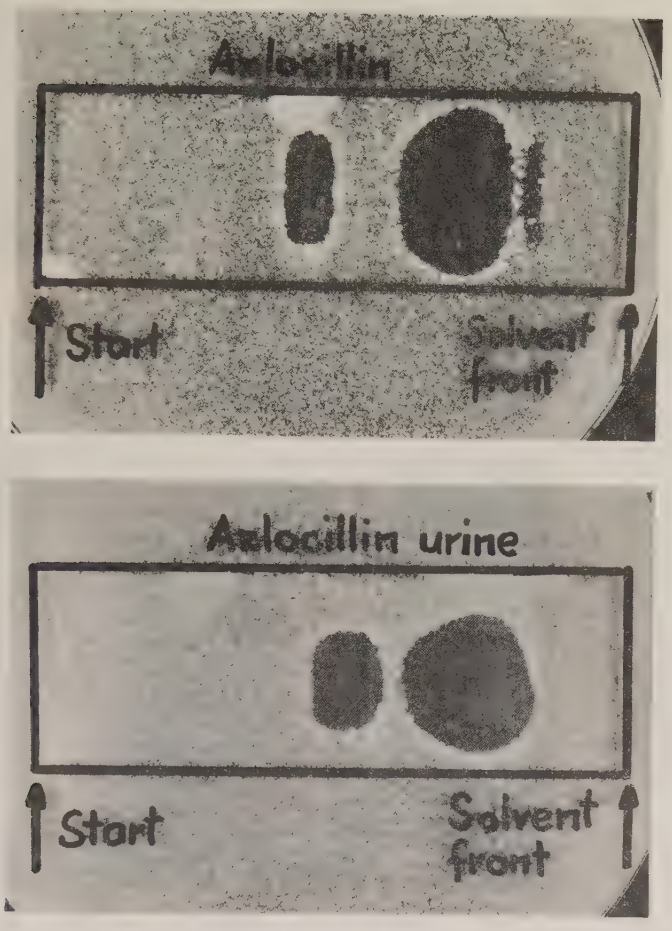


Abb. 26: Auftrennung von Azlocillin in wässriger Lösung sowie Darstellung der antibakteriellen Aktivität mit der Bioautographie.
a) 20 µl Azlocillinlösung (1g/l)
b) 5 µl Zweistundenurin
(Therapie: 3 x 5 g Azlocillin (Securopen^{R}))

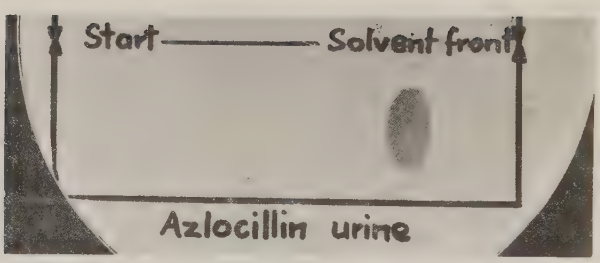


Abb. 27: Mikrobiologische Aktivität von Azlocillin im Urin gegenüber Pseudomonas aeruginosa. Aufgetragen wurden 10 µl Zweistundenurin.

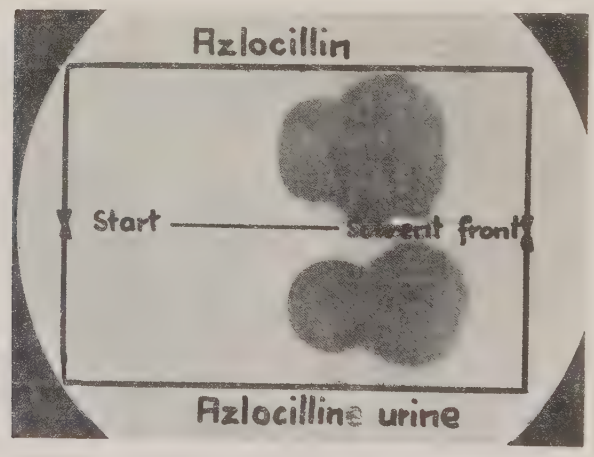


Abb. 28: Nachweis der Aktivität von Azlocillin in wässriger Lösung und in Urin gegenüber Staphylococcus aureus.
Aufgetragen wurden 10 µl Azlocillin (10g/l) und 10 µl Urin des gleichen Patienten entsprechend Abbildung 26.

Wurde Staphylococcus aureus als Testbakterium verwendet, so zeigte sich, daß beide Komponenten gegen Staphylococcus aureus wirkten (Abb. 28)

Ob diese Aktivität der langsamen Komponente einem bereits bekannten Antibiotikum entsprach, oder ob eine solche aktive Substanz bei der chemischen Synthese des Imidazolidinrings entstand, war aufgrund dieser Untersuchungen nicht zu entscheiden.
Auch für die Penicilline sei abschließend der Versuch unternommen, eine Tabelle für die Rf-Werte zu erstellen. Während Aminoglykoside eine gute Übereinstimmung der Rf-Werte für den chemischen Nachweis mit Ninhydrin, den antibakteriellen Nachweis wässriger Lösungen und den mit Urinproben ergaben, fand sich bei den Untersuchungen der Penicilline eine mehr oder weniger starke Streuung der Rf-Werte. Die Rf-Werte sind Mittelwerte aus mehreren Untersuchungen.

Antibiotikum	Rf-Werte in wässriger Lösung	Rf-Werte in Urin
Penicillin G	0,83	-
Mezlocillin	0,77	0,86
Carbenicillin	0,56	0,43
	0,84	0,85
Ticarcillin	0,54	0,43
	0,84	0,85
Azlocillin	0,50	0,51
	0,72	0,73
	0,85	-

Tab. 6: Rf-Werte der Penicilline auf Celluloseschichten. Auftrennung mit dem Fließmittelgemisch n-Propanol-Äthanol-Essigsäureäthylester-Wasser im Verhältnis 60 : 48 : 36 : 40

3. Hochdruckflüssigkeitschromatographische Untersuchungen an Penicillinen und Aminoglykosiden

3.1 Material und Methode

3.1.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

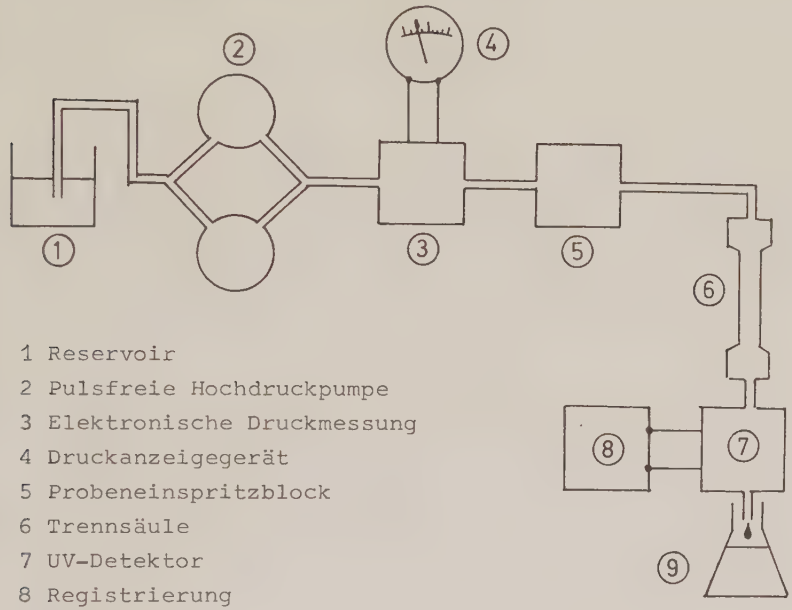
3.1.1.1 Allgemeines

Flüssig-chromatographische Verfahren werden vornehmlich zur Trennung von nicht unzersetzt verdampfbaren Substanzen verwendet.
Bei der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (englisch: HPLC = high pressure liquid chromatography) (24,14, 36, 43,15) verwendet man dünne Trennsäulen mit einem inneren Durchmesser von 2 bis 6 mm. Diese Trennsäulen sind mit Teilchen unter 50 µm gepackt. Durch einen hohen Druck bis zu 400 at, erzeugt durch ein Pumpensystem, wird die mobile Phase mit Strömungsgeschwindigkeiten bis 5 cm/sec durch die Säule gepresst. Die Chromatographiezeit verkürzt sich dadurch um mehr als den Faktor 10 gegenüber der Säulenchromatographie, was einen sehr rationellen Einsatz, zum Beispiel bei speziellen diagnostischen Untersuchungen erlaubt.

3.1.1.2 Aufbau eines Hochdruckflüssigkeitschromatographen

Die Pumpen (2) fördern aus dem Lösungsmittelreservoir (1) einen konstanten Strom. Der Eingangsdruck an der Trennsäule wird elektronisch gemessen (3) und ist kontinuierlich am Druckanzeigegerät (4) zu überprüfen. Kurz vor der Trennsäule (6) wird die Probe über den Einspritzblock (5) in den Eluentenstrom eingebracht. Die aus der Säule eluierte Substanz wird mit dem Detektor (7) nachgewiesen und mit einem Schreiber (8) registriert. Der verunreinigte Eluent wird aufgefangen und

verworfen (9) . Das Gerät kann, wenn gewünscht, durch einen vom Schreiber gesteuerten Fraktionssammler ergänzt werden (Abb. 29).



1 Reservoir
2 Pulsfreie Hochdruckpumpe
3 Elektronische Druckmessung
4 Druckanzeigegerät
5 Probeneinspritzblock
6 Trennsäule
7 UV-Detektor
8 Registrierung
9 Auffanggerät

Abb. 29: Schematischer Aufbau eines Hochdruckflüssigkeitschromatographen

Vorratsgefäß

Das zu verwendende Elutionsmittel wird in einem druckstabilen Erlenmeyerkolben mehrere Minuten durch Anlegen eines Vakuums entgast oder in ein Ultraschallbad gestellt. Elutionsmittel mit einem höheren organischen Lösungsmittelanteil eignen sich besser für das Ultraschallbad. Vor allem Eluenten mit einem Wassergehalt über 50 % sollten sehr gut entgast sein (mindestens 10 min), da sonst durch den Unterdruck entstehende Luftblasen den Arbeitsablauf beträchtlich beeinflussen.

Luftblasen im Pumpensystem verhindern den Aufbau eines konstanten Drucks und führen zu Pulsationen des Schreibers. Luftblasen im Detektor stören den Nachweis der Proben ganz empfindlich durch unterschiedlich lange, spontan auftretende Absorptionsänderungen.

Pumpen

Die Pumpen für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie sollen das Elutionsmittel bei hohem Druck kontinuierlich und pulsationsfrei in die Säule pressen. Die bereits erwähnten Fließgeschwindigkeiten bis zu 5 cm/sec ≙ 10 ml/min bei Drücken bis zu 400 at können durch verschiedene Pumpensysteme erzeugt werden.
In dem für diese Arbeit benützten Gerät der Firma Knauer werden die zwei Pumpenkolben aus Saphir durch einen elektronisch gesteuerten Motor so angetrieben, daß die Summe der Fördermenge der beiden Kolben stets konstant ist. Die Pulsation von Peak zu Peak beträgt weniger als 1 %. Es handelt sich um zwei Kurzhub-Kolbenpumpen mit veränderlicher Hubfrequenz.

Probeneinbringung

Im Gegensatz zur Gaschromatographie, wo die Proben mit einer Spritze in einen Einspritzblock durch ein Septum in den Eluentenstrom gegeben werden, verwendet man bei der Hochdruckflüssigkeitschromatographie eine Probeschleife, aus der die Probe durch den Eluenten in das System gespült wird. Bei diesem neu entwickelten System wird die Probe mit einer Spritze unter Normaldruck in eine Speicherschleife unmittelbar vor die Trennsäule gegeben (Abb. 29). Durch Umschalten von Membranventilen wird der Eluentenstrom durch die Speicherschleife gelenkt und die Probe auf die Trennsäule gespült. Um keine wesentliche Vermischung mit dem Eluenten zu ermöglichen, wird die Probe möglichst nahe vor

der Säule aufgegeben. Die hier verwandten Probeschleifen fassen 20 bis 100 µl.

Trennsäulen

Üblicherweise werden Säulen aus Edelstahl verwandt, obwohl für spezielle Probleme auch Säulen aus Glas oder Kupfer zur Verfügung stehen. Die Säulenlänge beträgt 10 bis 50 cm und hat für qualitative Untersuchungen eine innere Weite von 4 bis 6 mm. Da die in dieser Arbeit verwandten Säulen bereits gepackt geliefert wurden, sei auf die Probleme des Säulenpackens, sowie auf den Verschluß zum Schutz des Detektors nur hingewiesen (20).

Detektor

Der UV-Detektor und das Differentialrefraktometer sind die beiden heute in der Flüssigkeitschromatographie am häufigsten benützten Detektoren. Die UV-Detektoren sind bei Proben mit genügend großem Absorptionskoeffizienten und der entsprechenden Wellenlänge die empfindlichsten Detektoren. Allerdings ist man bei ihnen nicht mehr frei in der Wahl des Eluenten, was bei den meisten Untersuchungen nicht ins Gewicht fällt, da fast ausschließlich Wasser-Methanol-Gemische verwendet werdcn. Der Eluent muß bei der Wellenlänge des Detektors vollkommen UV-durchlässig sein, was mitunter Probleme aufwirft (siehe Aminoglykoside). Wegen der großen Empfindlichkeit der Detektoren muß nicht unbedingt am Absorptionsmaximum gemessen werden. Auch auf der Flanke der Bande erhält man noch ausreichende Empfindlichkeit. Für die Bestimmung der Penicilline erwies sich die Wellenlänge von 220 nm als am besten geeignet (vergleiche UV-Spektren der Penicilline), da Wasser und Alkohol eine gute Durchlässigkeit bei 220 nm besitzen. Alle Kurven wurden daher mit λ = 220 nm geschrieben.

3.1.1.3 Verwandte Geräte

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit einem Hochdruckflüssigkeitschromatograph der Firma Knauer gemacht. Das Gerät besteht aus der pulsfreien Hochdruckpumpe Typ 5200 und dem Spektralphotometer Typ 8100. Dieses Photometer erlaubt die Messung der UV-Absorption bei einer beliebigen Wellenlänge von 200 bis 600 nm.

3.1.1.4 Stationäre Phasen

Polare stationäre Phasen (Kieselgel und Aluminiumoxid)

Von den in der Flüssigkeitschromatographie angewandten Arten der Ausschluß-, Gelpermeations-, Ionenaustausch-, Verteilungs- und Adsorptionschromatographie wird am häufigsten das letztgenannte Verfahren angewandt.
Die Sorption beruht hierbei auf Wechselwirkung zwischen polarer Oberfläche des Adsorbers und den polaren Gruppen des adsorbierten Moleküls. Hierbei spielen die aus der Chemie bekannten Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, sowie Wasserstoffbrückenbindungen, π-Komplexbindungen und charge-transfer-Wechselwirkungen eine Rolle.
Vorbedingung für eine reproduzierbare Chromatographie ist eine annähernd lineare Sorptionsisotherme, da sonst die Retentionszeit von der Probenmenge abhängig wird (Abb. 30 a). Meist liegt eine konvexe Kurve vor, die eine Abnahme der Adsorption und damit eine Abnahme der Retentionszeit bedingt (Abb. 30 b).
Die Retentionszeiten hängen also von der Probenmenge ab und lassen somit eine qualitative Identifizierung nur bedingt zu. Ein weiteres Zeichen für die Überschreitung der Sättigungskonzentration ist ein asymetrischer Elutionspeak, das sogenannte Tailing (Abb. 30 d).
Unter 0,1 mg Probe / g Adsorbens liegt man im allgemeinen im linearen Bereich der Isotherme (42). Bei einer

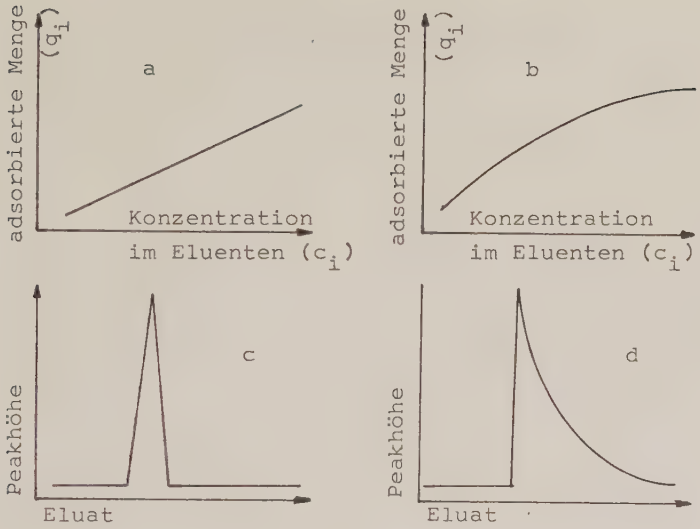


Abb.30: Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit der adsorbierten Menge q_i von der Konzentration im Eluenten bei gerader Sorptionsisotherme (a) und bei konvexer Sorptionsisotherme (b). Der Zusammenhang beider Größen ist durch die Langmuirsche Gleichung

$$q_i = \frac{k_1 k_2 c_i}{1 + k_1 c_i}$$

(k_1 und k_2 sind Konstanten) gegeben. Die daraus resultierenden Peakformen zeigen (c) und (d).

Einwaage von 10 g/l entsprechen 10 µl Einspritzung etwa 0,1 g Probe. Dabei ist man also weit unter dieser Grenze. Bei der Injektion von 10 µl Urin bleibt man zwar mit der Konzentration der nachzuweisenden Substanz ebenfalls unter dieser Grenze, der wechselnd hohe Anteil anderer Urinbestandteile verursacht jedoch eine mögliche Überschreitung der Belastungsgrenze für das Arbeiten im linearen Bereich. Diese Tatsache erklärten die mitunter veränderten Retentionszeiten der zu bestimmenden Substanzen im Urin

Erlaubt es die Problemstellung, mit wässrigen Eluenten zu arbeiten (zum Beispiel Wasser-Methanol-Gemischen), so wird der lineare Bereich der Isotherme sogar noch vergrößert. Ist es jedoch notwendig, mit wasserfreien Gemischen zu arbeiten, so muß darauf geachtet werden, daß diese Lösungsmittel tatsächlich absolut wasserfrei sind oder einen immer konstanten Wasseranteil besitzen. An dem polaren Adsorbens bildet sich nämlich ein Gleichgewicht zwischen Wassergehalt des Adsorbens und Wassergehalt des Eluenten aus. Dieses wird durch Einspritzen von 10 µl wässriger Probenlösung derart gestört, daß nicht reproduzierbare Retentionszeiten die Folge sind (12). Wassergesättigtes Heptan beispielsweise oder Chloroform mit Spuren für die Stabilisierung zugesetztem Alkohol bewirken durch den Zusatz der polaren Komponente völlig veränderte Eigenschaften des Adsorbens gegenüber der Anwendung wasserfreier Substanzen (12).
Weiterhin spielt die Löslichkeit der Proben im Eluenten eine Rolle. Sind die Substanzen nur in Eluenten löslich, aus denen ihre Retention am gegebenen Adsorbens gering ist, dann muß die stationäre Phase geändert werden. Dies traf in gewissem Umfang für die Löslichkeit der Penicilline in Äthanol zu. Sehr häufig ist dann das Ausweichen auf ein reversed-phase-System möglich.
Die Wahl der Lösungsmittel trifft man aufgrund ihrer Stellung in der eluotropen Reihe. Der Satz "Je größer die Polarität des Lösungsmittels, desto kürzer die Retentionszeit" charakterisiert am besten die Auswirkung der Lösungsmittelstärke ε_o auf die Retention (Abb. 31). ε_o stellt hierbei ein gutes Maß für die Retentionskraft dar.
Die Verwendung von Lösungsmittelgemischen erlaubt es, die Möglichkeiten der Adsorptionschromatographie voll auszunutzen, da die Polaritätsunterschiede der Reinsubstanzen oft bereits zu groß sind. Schon bei geringer Zugabe der polaren Komponente steigt das Elutionsvermö-

	ε_o
n Pentan	0,00
Benzol	0,32
Chloroform	0,40
Aceton	0,56
Acetonitril	0,65
Äthanol	0,88
Methanol	0,95
Wasser	sehr groß

Abb. 31: Stellung einiger wichtiger Lösungsmittel in der eluotropen Reihe.
Die angegebenen ε_o -Werte beziehen sich auf Aluminiumoxid.

gen stark an, während eine weitere Erhöhung nur noch geringe Änderungen bewirkt.
Am stärksten wird die Reihenfolge der Elution durch die molekulare Struktur der Proben beeinflußt. Die Zahl der funktionellen Gruppen bestimmt bei den polaren stationären Phasen fast ausschließlich die Stärke der Retention, während die Löslichkeit im Gegensatz zu unpolaren stationären Phasen nur selten eine Rolle spielt.
Die Retention steigt etwa in der folgenden Reihenfolge an:
Alkyl < Halogen < Äther < tertiäre Amine < Nitrile < Nitroverbindungen < Carbonsäureester < Ketone < Aldehyde < primäre Amine < Carbonsäureamide < Alkohole < Phenole < Carbonsäuren < Sulfonsäuren.

Unpolare stationäre Phasen

Die Adsorptionseigenschaft und die Selektivität der stationären Phase wird durch die Hydroxylgruppen an der

Oberfläche von Kieselgel oder Aluminium bestimmt. Werden diese Gruppen mit organischen Verbindungen umgesetzt, so ändert sich das chromatographische Verhalten des Festkörpers zum Teil beträchtlich. Die an der Kieselgeloberfläche sitzenden Silanolgruppen können mit primären Alkoholen verestert werden (16). Diese Si-O-C-Verbindungen sind jedoch hydrolyseempfindlich. Stabiler sind die entsprechenden Si-N-C-Verbindungen (9). Neue Si-O-Si-Verbindungen entstehen durch Umsetzen der Silanolgruppen mit Monochlorsilanen (Abb. 32 a) oder mit Dichlorsilanen (Abb. 32 b). Verwendet man Trichlorsilane, so entstehen Polysiloxane (Abb. 32 c). Man spricht dann von gebundenen Silikonölen (5,17).

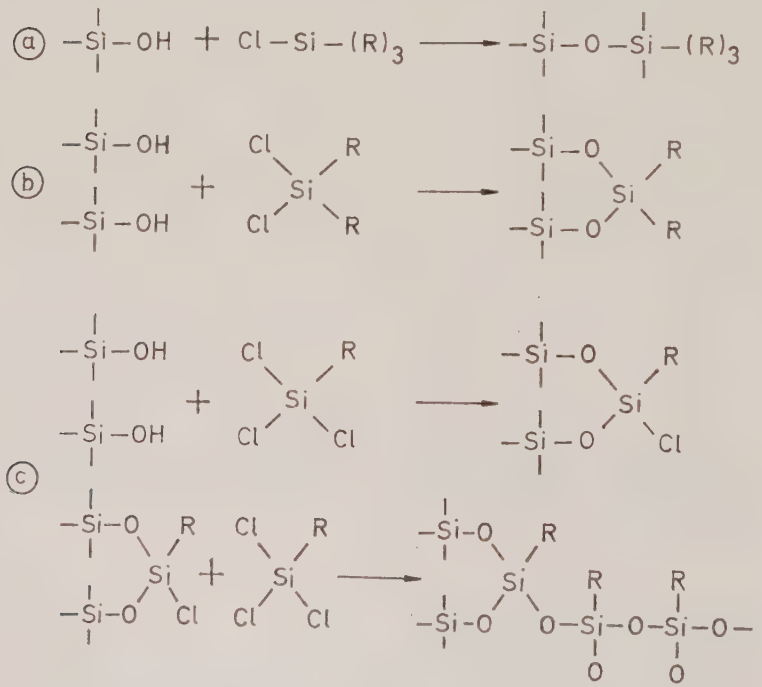


Abb. 32: Umsetzung des Kieselgels mit Monochlorsilanen (a), Dichlorsilanen (b) und Trichlorsilanen (c) zu entsprechend modifizierten stationären Phasen.

Die gleichen Umsetzungen lassen sich mit pourous layer beds (PLB)-Substanzen (vergleiche 3.1.1.5) durchführen. Durch die Polymerisation entstehen hierbei relativ dichte Filme (26,25). Diese Phasen mit gebundenen Polysiloxanen ähneln demnach Verteilungssystemen, bei denen der Festkörper mit einer im Eluenten unlöslichen Trennflüssigkeit belegt ist. Diese Art der belegten Teilchen besitzt gegenüber den konventionellen, mit flüssiger Phase belegten Teilchen, bedeutende Vorteile.
Bestehen die Reste R ausschließlich aus Alkylgruppen, wobei Kettenlängen von C_4- bis C_{18}-Atomen verwendet werden, so entstehen, wie schon erwähnt, die stationären Phasen für die reversed-phase-Chromatographie.
Diese reversed-phase-Chromatographie geht auf Howard und Martin (20) zurück, die Kieselgel mit Paraffinöl und Octan belegten und mit einem wässrigen Eluenten an diesem System Fettsäuren trennten. Durch die Silanisierung wurde die Belegbarkeit des Kieselgels beträchtlich verbessert. Die Retention der Probe an Kieselgel mit unpolaren Eluenten hängt von der Wechselwirkung mit den Silanolgruppen ab. Je weniger Gruppen vorhanden sind, desto größer sind die k'-Werte der Proben bei konstanter Eluentenzusammensetzung. k' ist eine aus physikalisch-chemischen Daten abzuleitende Größe, die ein Maß für die Retention darstellt. Auch die Belastbarkeit der Trennsäule nimmt mit zunehmender Kohlenstofflänge zu. So ist eine C_{18}-Säule doppelt so hoch belastbar wie eine C_4-Säule. Gegenüber einer reinen Kieselgelsäule (zum Beispiel SI 100) liegt die Belastung einer C_{18}-Säule mit 2 mg Probe / g stationäre Phase bereits um mehr als eine Zehnerpotenz höher. Da die Retention organischer Proben bei Umkehrphasen mit Wasser als Eluent am größten sind, läßt sich die Elution der Proben durch Konzentrationserhöhung eines organischen Lösungsmittels beschleunigen.

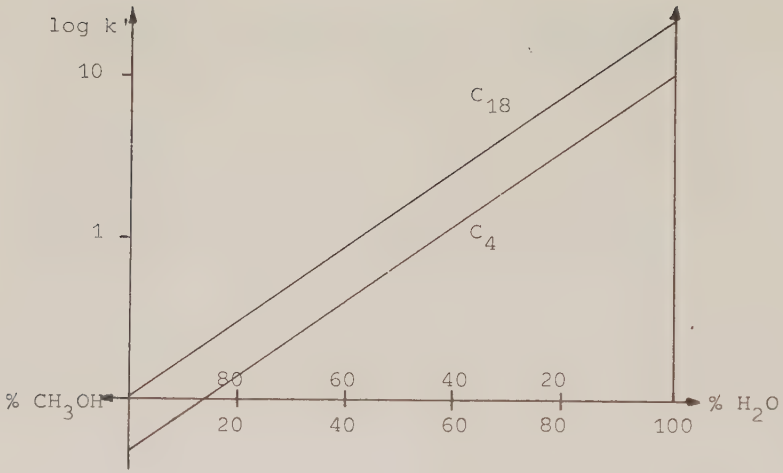


Abb. 33: Abhängigkeit der k'-Werte des Phenols von der Eluentenzusammensetzung (Wasser-Methanol-Gemisch). Stationäre Phase RP 4 und RP 18 (12)

Wie aus Abb. 33 zu sehen ist, entsteht durch Erhöhung der Methanol-Konzentration eine Abnahme des k'-Wertes, also Abnahme der Retention, die bei Verlängerung der Alkylkette teilweise kompensiert wird. Alle anderen organischen Lösungsmittel bewirken eine wesentlich schnellere Elution, wie aus der eluotropen Reihe für Umkehrphasen zu entnehmen ist.

	C_8	C_{18}
Methanol	1,0	1,0
Acetonitril	3,2	3,1
Äthanol	3,2	3,1
Isopropanol	8,4	8,3
Dioxan	12,5	11,7

Abb. 34: Stellung einiger wichtiger Lösungsmittel in der eluotropen Reihe für Umkehrphasen.

Ein weiterer großer Vorteil des reversed-phase-Systems gegenüber dem reinen Kieselgel ist die rasche Einstellung eines neuen Gleichgewichts bei Eluentenwechsel innerhalb weniger Minuten (20-facher Durchfluß des Säulenvolumens), während bei reinem Kieselgel bis zu zwei Stunden vergehen, ehe das neue Gleichgewicht eingestellt ist.
Auch der Einfluß der Struktur der Probensubstanz ist bei Umkehrphasen übersichtlicher. So findet sich eine Zunahme der Retention mit abnehmender Löslichkeit in Wasser, das heißt abnehmender Polarität.
Die Erhöhung des hydrophoben Charakters einer Probe durch Einführung eines Substituenten führt stets zu einer Erhöhung des k'-Werts, also zu einer Zunahme der Retention (18, 19, 22).
Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß die Umkehrphasen für Proben geeignet sind, die sehr polar sind und nur in solchen Eluenten löslich, aus denen die Sorption an Kieselgel gering ist. Dies gilt vor allem für Substanzen, die beispielsweise nur in Wasser oder Alkohol gelöst werden können.
Bei der Auftrennung der Aminoglykoside (siehe Abschnitt 3.5) wurde mit einer Kationenaustauschersäule gearbeitet. Diese Säulen wurden ausgehend von reversed-phase-Systemen hergestellt. Sie tragen an Stelle der reinen Alkylgruppen Alkylsulfonsäure- und Arylsulfonsäuregruppen. Einige allgemeine Beschreibungen von Trägermaterialien für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie können folgenden Literaturstellen entnommen werden (11, 27, 28, 30).

3.1.1.5 Verwendete Säule

Als polare stationäre Phase stand eine Lichrosorb SI 100 Säule der Firma Merck AG, Darmstadt zur Verfügung. Das Kieselgel dieser Säule besitzt eine Oberfläche von 400 m^2/g Füllung, ein Porenvolumen von 1 mg / g Füllung bei einem Porendurchmesser von 100 Å. Die Teilchen haben irreguläre Form und sind 5 bis 30 µm groß. Als unpolare stationäre Phase für die reversed phase-Chromatographie standen Lichrosorb RP 8 und RP 18 Säulen der Firma Merck AG Darmstadt zur Verfügung. Die dünne, poröse, aktive Kieselgelschicht wurde bei diesen Säulen auf einen dichten Glaskern gebracht, sogenannte PLB- (= pourous layer beds) Teilchen,und entsprechend silanisiert. Die Dicke der porösen Schicht beträgt 1 bis 3 µm (≙ 1/30 des Teilchendurchmessers). Die Menge der stationären Phase und die spezifische Oberfläche (15 m^2/g Füllung) sind hierbei zwar gering, jedoch sind diese Teilchen sehr druckstabil.

3.1.2 UV-Absorptionsspektren

Die Abbildung 35 zeigt die UV-Spektren von vier Penicillinen. Aus diesen Spektren geht hervor, daß die Präparate bei 325 nm ein geringes Absorptionsmaximum aufwiesen. Dieses reichte jedoch für den Nachweis der Verbindungen vor allem im Harn nicht aus. Der steile und hohe Absorptionsanstieg unterhalb der Wellenlänge 260 nm, bedingt durch das aromatische Ringsystem, erlaubte eine wesentlich empfindlichere Photometereinstellung am UV-Detektor. Als optimale Wellenlänge für die Messung ergab sich daher λ = 220 nm. Die UV-Absorptionsspektren wurden mit einem Spektralphotometer der Firma Beckman (Modell DB-G) aufgenommen, und an einem Zehnzollschreiber direkt logarithmisch registriert.

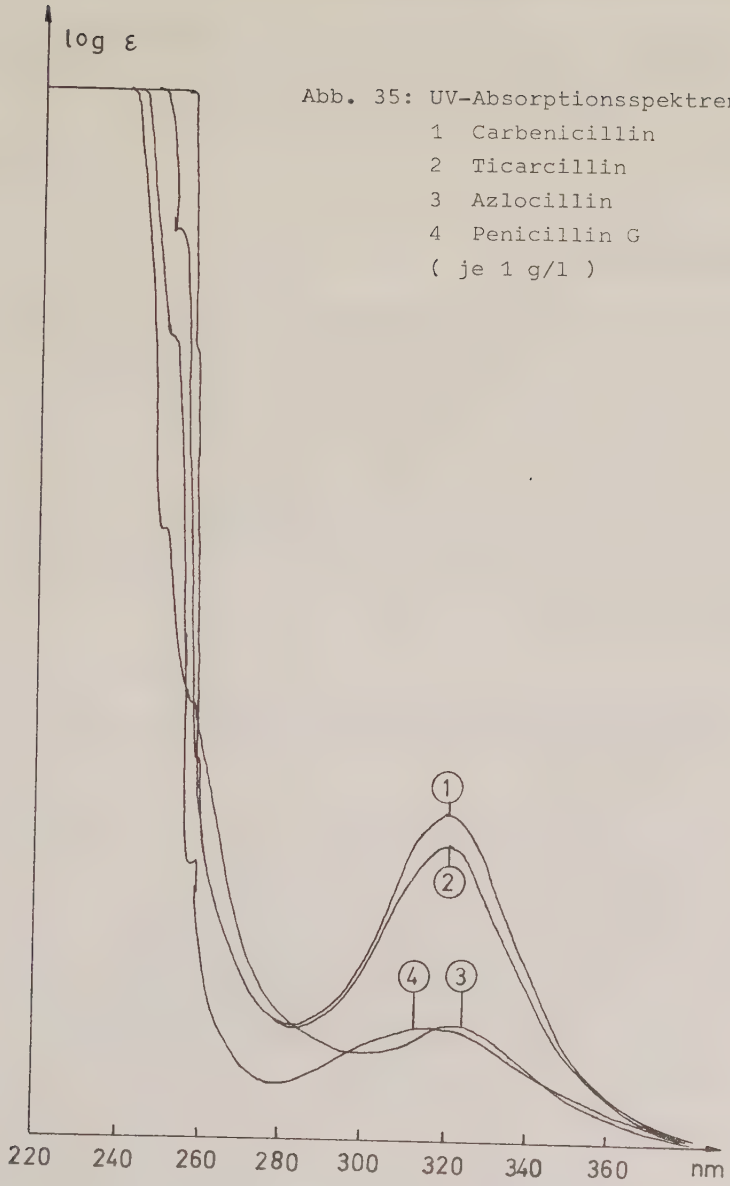


Abb. 35: UV-Absorptionsspektren
1 Carbenicillin
2 Ticarcillin
3 Azlocillin
4 Penicillin G
(je 1 g/l)

3.1.3 Antibiotika-Lösungen und Konzentrationen

Es wurden die gleichen Substanzen in wässriger Lösung verwendet wie für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen. Die Konzentrationen 1 g/l und 10 g/l erwiesen sich auch hierfür geeignet.

3.1.4 Eluenten

Bei polaren stationären Phasen wurde zur Stabilisierung der zu trennenden Substanzen dem wasserhaltigen Eluenten 1 ml 1%ige $NaHCO_3$-Lösung / 100 ml Wasser zugesetzt.
Bei unpolaren stationären Phasen wurde mit einer wässrigen 0,05%igen $(NH_4)_2CO_3$-Lösung gearbeitet.
Beide Zusätze wurden bei den Legenden der Abbildungen nicht zusätzlich angegeben. H_2O bedeutet bei SI 100 Säulen immer den Zusatz von 1%iger $NaHCO_3$-Lösung, bei RP 18 Säulen steht H_2O immer für eine wässrige 0,05%ige $(NH_4)_2CO_3$-Lösung.

3.2 Bisherige Untersuchungen zur Auftrennung von Penicillinen

In einer Arbeit zur Problematik der Penicillintrennung mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie gelang Kim (23) die Trennung von 10 Präparaten mit einer Lichrospher SI 100 Säule. Als Fließmittel benutzte er Methanol-Wasser-1%ige $NaHCO_3$-Lösung im Verhältnis 25 : 75 : 0,1. Carroll et al. (10) trennten Cephalosporine mit verschiedenen Säulen auf, wie aus der folgenden Zusammenstellung ersichtlich ist.

Säule	Fließmittel	
u Bondapack C_{18}	0,03%ige$(NH_4)_2CO_3$-Lösung in H_2O	95
	CH_3OH	5
Lichrosorb SI 100 C_{18}	0,06%ige$(NH_4)_2CO_3$-Lösung in H_2O	100
Sil-X-11	0,5%ige$(NH_4)_2CO_3$-Lösung in H_2O	98
(Octadecylsilyl)	CH_3OH	2

3.3 Eigene Untersuchungen zur Auftrennung von Penicillinen

Vorausgeschickt sei, daß die sehr ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften des Benzols und Thiophens von Carbenicillin beziehungsweise Ticarcillin ein sehr ähnliches physikalisch-chemisches Verhalten erwarten lassen.
In Anlehnung an Kim wurde zuerst mit einer Lichrosorb SI 100 Säule versucht, das Azlocillin von Carbenicillin und Ticarcillin abzutrennen. Als Eluent wurde Methanol-Wasser 75 : 25 und Äthanol-Methanol 80 : 20 verwendet. Dem wasserhaltigen Eluenten wurde zur Stabilisierung der zu trennenden Substanzen 1 ml 1%ige $NaHCO_3$-Lösung / 100 ml Eluent zugesetzt. Dieser Zusatz stabilisiert alle Substanzen, die eine Carboxyl-, Hydroxyl- oder Amino-Gruppe besitzen und verhindert dadurch das Auftreten von allzu starkem Tailing (23).
Die meisten Untersuchungen wurden jedoch mit einer Umkehrphase gemacht. Da sich die Kapazität der RP 8

Säule als zu gering erwies, wurde eine RP 18 Säule verwendet. Für diese war je nach Problemstellung eines der folgenden Eluentengemische geeignet:

1)	Wasser - Methanol	50 : 50
2)	Wasser - Methanol	60 : 40
3)	Wasser - Methanol	70 : 30
4)	Wasser - Methanol	80 : 20
5)	Wasser - Methanol	95 : 5
6)	Wasser - Methanol	98 : 2
7)	Wasser	100

Zur Stabilisierung der zur Trennung vorgesehenen Substanzen wurde mit einer wässrigen 0,05%igen $(NH_4)_2CO_3$-Lösung gearbeitet. Die stabilisierende Wirkung hat bereits Carroll bei seinen Untersuchungen mit Umkehrphasen an Cephalosporinen bestätigt (10).

3.4 Ergebnisse und Diskussion

3.4.1 Diskussion der Ergebnisse von Untersuchungen mit Lichrosorb SI 100 Säulen

Mit dem Eluenten Methanol-Wasser 75 : 25 zeigten die Penicilline nur sehr geringe Unterschiede in ihren Rf-Werten. Meist sah man bei dieser Mischung je nach Kombinationsverhältnis nur eine deutliche Schulter im dominierenden Gipfel. Gelegentlich gelang jedoch die Auftrennung in 2 getrennte Peaks (Abb. 36). Die Reproduzierbarkeit mußte allerdings in Frage gestellt werden. Anders jedoch beim Nachweis des Ticarcillin im Urin. Der Leerurin (vor Therapiebeginn abgenommen) enthielt zwar eine leichte Schulter am Rf-Wert des Ticarcillin, der Zweistundenurin dagegen zeigte einen deutlichen Peak bei 0,9 Minuten. Auch der Vierstundenurin zeigte diesen Peak noch sehr deutlich, während der Sechsstun-

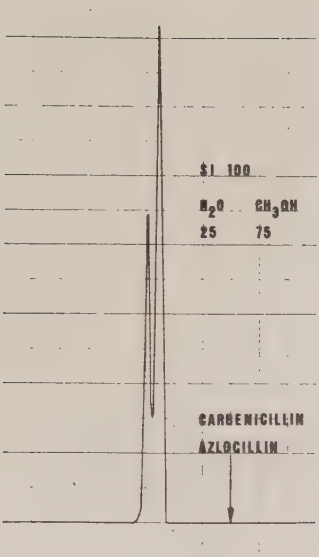


Abb. 36:
20 µl einer wässrigen Lösung aus gleichen Teilen Carbenicillin und Azlocillin.
Flußrate 1,5 ml/min
psi 90 µA
Photometerverstärkung 2
Papiervorschub 20 mm/min

denurin wieder eine Schulter zeigte, die aber deutlich höher lag als beim Leerurin (Abb. 37).

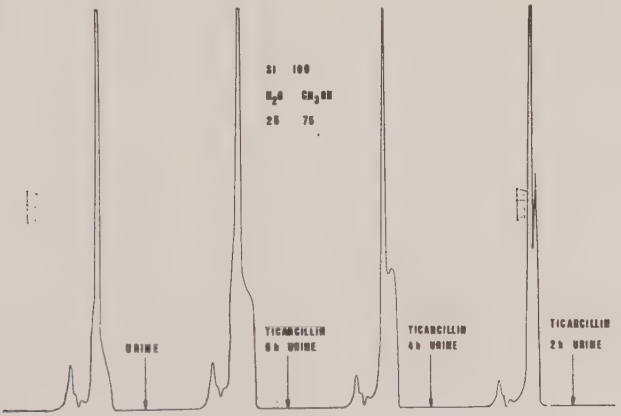


Abb. 37: Je 10 µl Urin eines Patienten, behandelt mit 3x5 g Ticarcillin (Aerugipen^{R}). Flußrate 2,0 ml/min, psi 100 µA, Photometerverstärkung 2 Papiervorschub 20 mm/min.

Um an SI 100 Säulen eine bessere Auftrennung zu erreichen, mußte die Polarität des Eluenten verringert werden, also der Anteil der unpolaren Substanzen im Eluentengemisch vergrößert werden. Verwandte man reines Äthanol, so waren die Gipfel der länger retinierten Substanzen bereits ziemlich breit. Mit dem Verhältnis Äthanol-Methanol 80 : 20 erzielte man einen guten Mittelweg zwischen zu breiten Peaks und einer annehmbaren Trennung (Abb. 38).

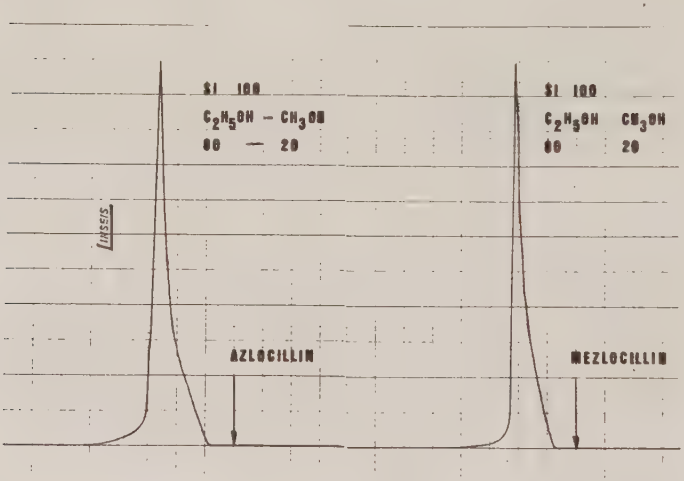


Abb. 38: Je 10 µl Azlocillin, beziehungsweise Mezlocillin (10 g/l) gelöst im Eluenten.
Flußrate 4,0 ml/min, psi 160 µA, Photometerverstärkung 2, Papiervorschub 20 mm/min.

Mezlocillin (Retentionszeit 1,1 Minuten) und Azlocillin (Retentionszeit 1,3 Minuten) zeigten einen langsamen Anstieg und plötzlichen Abfall der Kurven, ein sogenanntes leading. Derartige Elutionsbanden erhielt man bei schlechter Löslichkeit der Substanz im Eluenten (12). Carbenicillin (Retentionszeit 2,15 Minuten) und Ticarcillin (Retentionszeit 1,9 Minuten) waren hiervon deutlich abzugrenzen (Abb. 39).

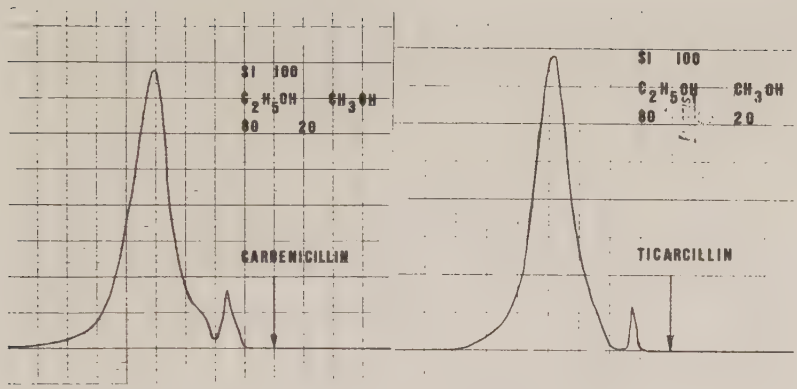


Abb. 39: 10 µl Carbenicillin, beziehungsweise Ticarcillin gelöst im Eluenten (10 g/l).
Flußrate 4,0 ml/min, psi 160 µA, Photometerverstärkung 1, Papiervorschub 20 mm/min.

Alle Präparate waren im Eluenten gelöst, um jeden Wassergehalt auszuschließen, da sonst das am Silicagel 100 eingestellte Wasser-Gleichgewicht laufend verändert und die Reproduzierbarkeit nicht mehr gewährleistet war. Hieraus ergab sich, daß dieses System für den Nachweis der Penicilline im Urin nicht geeignet ist.
Bei der Chromatographie eines Gemisches von vier Präparaten zeigten sich drei Peaks (Abb. 40). Carbenicillin (Retentionszeit 1,95) und Ticarcillin (Retentionszeit 1,8) sind eindeutig zuzuordnen. Die beiden anderen Gipfel mit den Retentionszeiten von 1,2 Minuten und 1,0 Minuten entsprechen Azlocillin beziehungsweise Mezlocillin. Es scheint, als seien trotz konstanter Arbeitsbedingungen die Retentionswerte zu kürzeren Zeiten hin verschoben, wenn man die Retentionszeiten der Trennung mit den einzelnen Kurven vergleicht. Dies stellte bereits Kim (23) fest. Er fand ebenfalls eine Änderung der Retentionszeit, wenn er eine Probe mehrmals hintereinander einspritzte.

Wie das Tailing der Kurven zeigt, besteht weiterhin die Möglichkeit, nicht ganz auf einer geraden Sorptionsisothermen zu arbeiten. Die SI 100 Säulen sind hierbei wesentlich empfindlicher als die reversed-phase-Systeme.

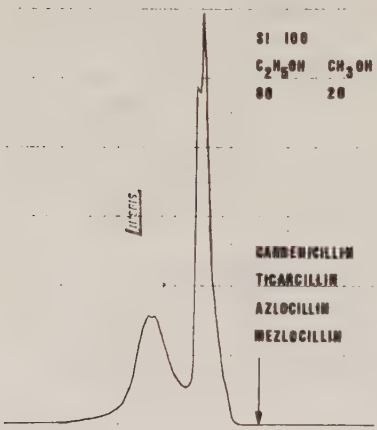


Abb. 40:
10 µl Gemisch aus 4 Präparaten (1o g/l)
Flußrate 4 ml/min
psi 160 µA
Photometerverstärkung 1
Papiervorschub 20 mm/min

3.4.2 Diskussion der Ergebnisse von Untersuchungen mit Lichrosorb RP 18 Säulen

Eine wesentlich bessere Trennung und Reproduzierbarkeit erlaubte das Arbeiten mit einem reversed-phase-System. Bereits mit dem Eluentengemisch Methanol-Wasser 50 : 50 war eine Trennung der vier Substanzen in drei Peaks möglich (Abb. 41 a). Die sehr polaren Verbindungen Carbenicillin und Ticarcillin (Retentionszeit beider 0,68 Minuten) mit ihren zwei Carbonsäuregruppen wurden von der unpolaren Säure sofort eluiert. Hier wurde ebenfalls sichtbar, daß der geringe chemische Unterschied zwischen beiden Substanzen praktisch keine Auftrennung erlaubt. Der zweite Gipfel mit einer Retentionszeit von 0,96 Minuten entspricht dem Azlocillin, und der dritte dem

Penicillin G (Retentionszeit 1,08 Minuten).Gab man diesem Gemisch noch Mezlocillin zu (Retentionszeit 0,98 Minuten), so waren Azlocillin und Penicillin G jeweils nur noch als Schulter zu erkennen (Abb. 41 b). Nur ein Papiervorschub von 50 mm/Minute erlaubte die Aufzeichnung dieser geringen Retentionsunterschiede, so daß ein direkter Vergleich der Kurven (vergleiche Eluentengemisch Methanol-Wasser 30 : 70) etwas erschwert ist, da sich bei Eluentengemischen mit höherem Wassergehalt ein Papiervorschub von 10 mm/Minute am besten für die Aufzeichnung eignete.

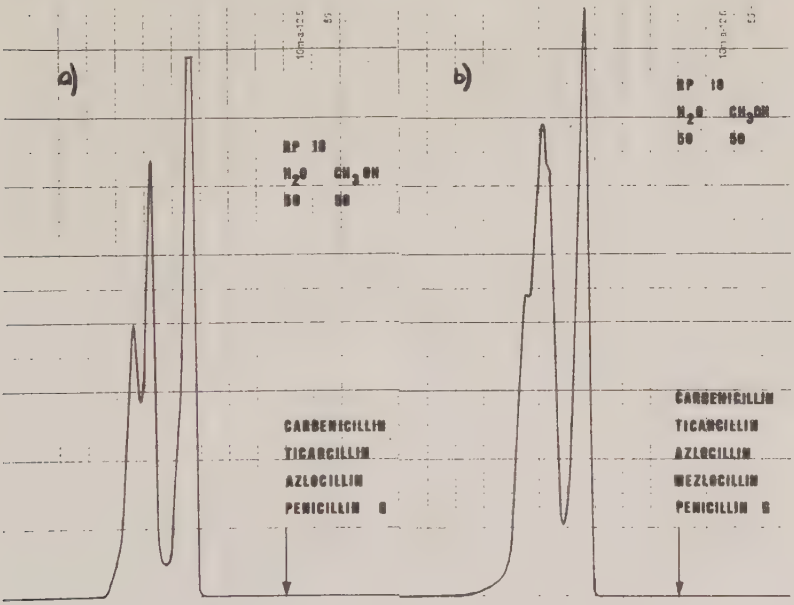


Abb. 41: Es wurden jeweils 10 µl eines Gemisches (10 g/l) injiziert.
Flußrate 3 ml/min
psi 180 µA
Papiervorschub 50 mm/min

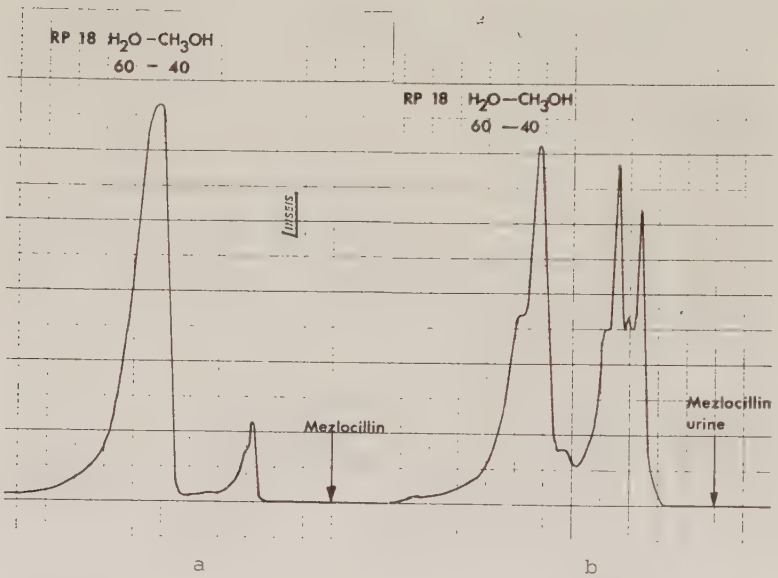


Abb. 42: a) 10 µl Mezlocillin (10 g/l), Flußrate 4 ml/min, psi 200 µA, Photometerverstärkung 2.
b) 10 µl Zweistunden-Mezlocillinurin, Flußrate 4 ml/min, psi 200 µA, Photometerverstärkung 1
a) und b) Papiervorschub 50 mm/min

Durch Zunahme des Wassergehalts im Eluenten auf 60 % erhöhten sich die Retentionszeiten. Bei Mezlocillin vergrößerte sich die Retentionszeit auf 1,24 Minuten (Abb. 42 a). Die Abbildung 42 b zeigt weiterhin den Nachweis des Mezlocillin in einer Zweistunden-Urinprobe eines mit Mezlocillin (Baypen^R) behandelten Patienten. Die Retentionszeiten des Mezlocillin in wässriger Lösung und im Urin sind identisch.
Bei Azlocillin vergrößerte sich die Retentionszeit auf 1,08 Minuten (Abb. 43). Da im Urin eines unbehandelten Patienten keine wesentliche Absorption bei dieser Retentionszeit vorhanden war (Abb. 44), war der Nachweis

von Azlocillin im Urin ebenfalls möglich, wie Abbildung 45 zeigt. Auch die Abnahme der Antibiotikumkonzentration vom Zweistunden- zum Sechsstundenurin läßt sich aus dem Verlauf der Absorptionsmaxima entnehmen.

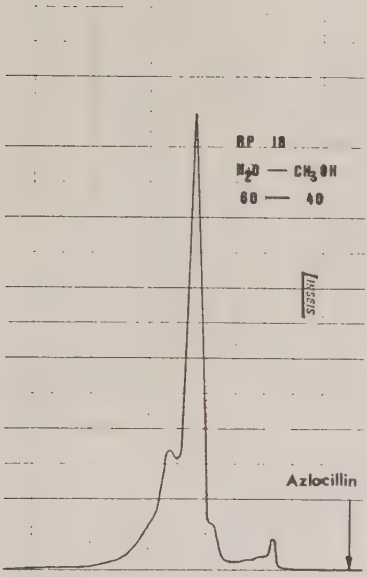


Abb. 43:

10 µl Azlocillin (10 mg/ml)
Flußrate 4 ml/min
psi 200 µA
Photometerverstärkung 2
Papiervorschub 50 mm/min

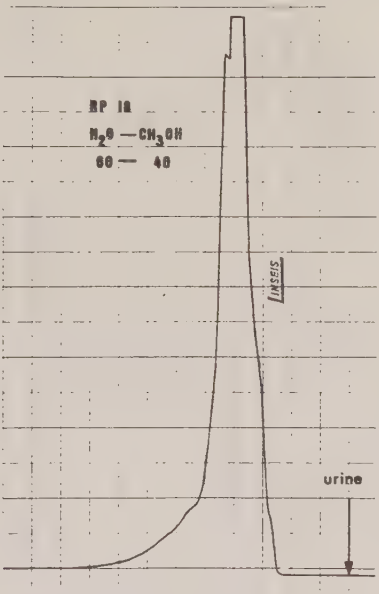


Abb. 44:

10 µl Urin eines unbehandelten Patienten
Flußrate 4 ml/min
psi 200 µA
Photometerverstärkung 1
Papiervorschub 50 mm/min

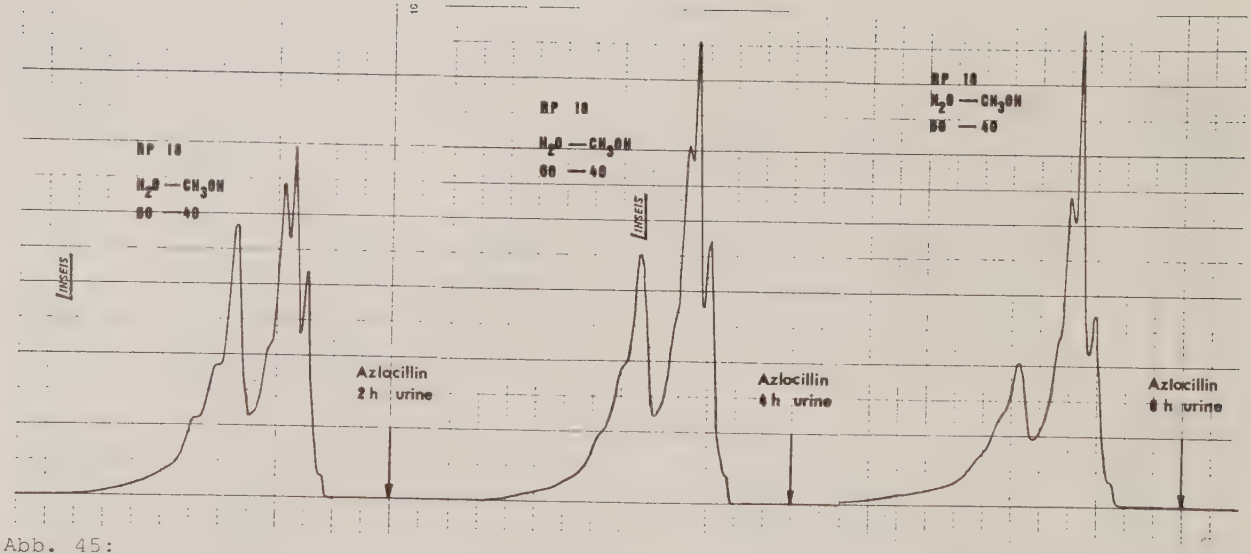


Abb. 45:

Zweistunden-, Vierstunden- und Sechsstunden-Urinprobe (je 10 µl) eines mit 3x5 g Azlocillin (Securopen^R) und 3x80 mg Gentamicin (Refobacin^R) behandelten Patienten. Deutlich ist bei einer Retentionszeit von 1,08 Minuten (Papiervorschub 50 mm/min) das Azlocillin zu erkennen. Im Vierstundenurin ist die Konzentration an Antibiotika etwas niedriger als im Zweistundenurin. Im Sechsstundenurin jedoch ist eine deutliche Konzentrationsabnahme erkennbar.

Flußrate 4 ml/min, psi 200 µA, Photometerverstärkung 1, Papiervorschub 50 mm/min.

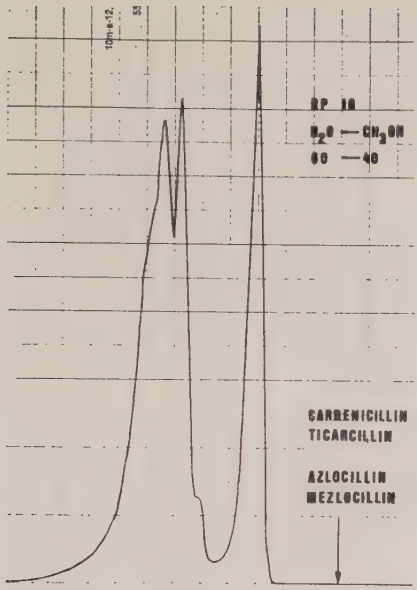


Abb. 46:

10 µl Gemisch (10 g/l)
Flußrate 4 ml/min
psi 200 µA
Photometerverstärkung 1
Papiervorschub 50 mm/min

Aufgrund der Retentionsverlängerung gelang jetzt eine eindeutige Trennung von Azlocillin und Mezlocillin (Abb. 46). Als erstes wurden bei 0,6 Minuten wieder Carbenicillin und Ticarcillin eluiert. Bei 1,08 Minuten zeigte sich Azlocillin und erst bei 1,24 Minuten erschien das eindeutig von Azlocillin getrennte Mezlocillin.

Beim Übergang auf die Eluentenzusammensetzung Wasser-Methanol 70 : 30 trat eine erhebliche Zunahme der Retention auf, so daß bei einem Papiervorschub von 50 mm/min unförmige breite Gipfel entstanden. Erst mit 10 mm/min Papiervorschub waren die Elutionskurven gut zu dokumentieren.

Bei diesem hohen Wasseranteil im Eluenten spaltete das Azlocillin in 2 deutlich getrennte Peaks auf (2,2 und 2,9 Minuten) (Abb. 47 a). Durch Zugabe von Mezlocillin

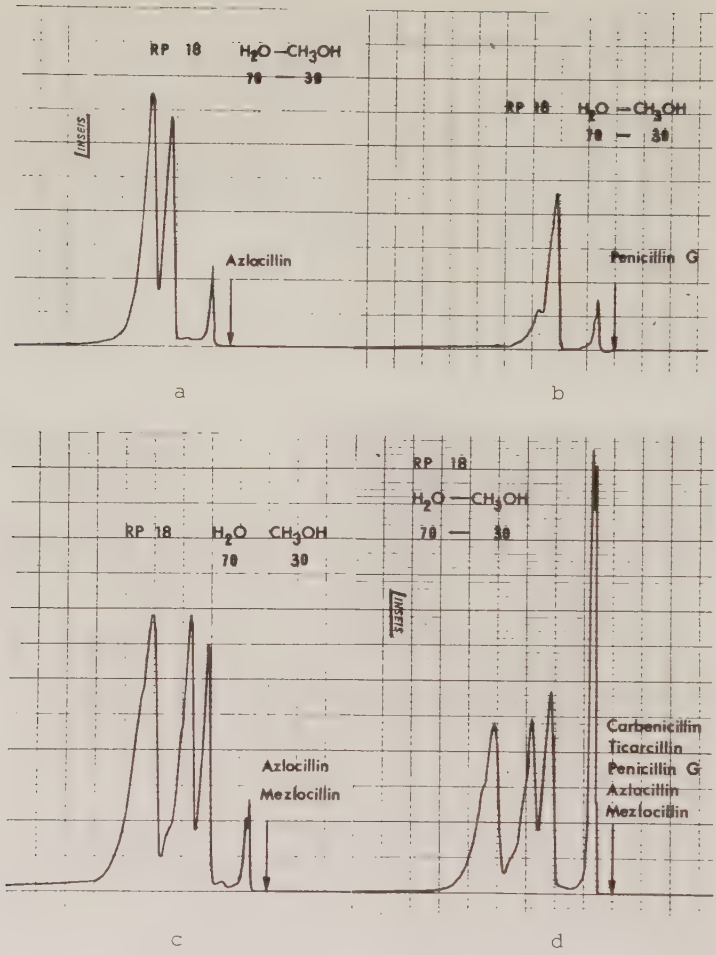


Abb. 47:

a) 10 µl Azlocillin (10 g/l)
b) 10 µl Penicillin G (10 g/l)
c) 20 µl eines Gemisches Azlocillin und Mezlocillin 10 g/l)
d) 20 µl eines Gemisches aller Antibiotika (10 g/l)

Flußrate 4 ml/min, psi 190 µA, Photometerverstärkung 1/2
Papiervorschub 10 mm/min

ergab sich für dieses eine Retentionszeit von 4,1 Minuten (Abb. 47 c). Durch Zusatz von Ticarcillin und Penicillin G (Abb. 47 d) stellten sich diese mit einer Retentionszeit von 0,7 beziehungsweise 2,2 Minuten dar. Interessant war hierbei die relative Abnahme der Absorptionsmaxima von Azlocillin und Mezlocillin bei Zugabe von Ticarcillin, obschon das gespritzte Gesamtvolumen von 20 µl konstant blieb. Gleichzeitig wurde das Absorptionsmaximum des Azlocillin bei 2,2 Minuten höher,da sich ihm die Absorption des Penicillin G (Abb. 47 b) überlagerte.

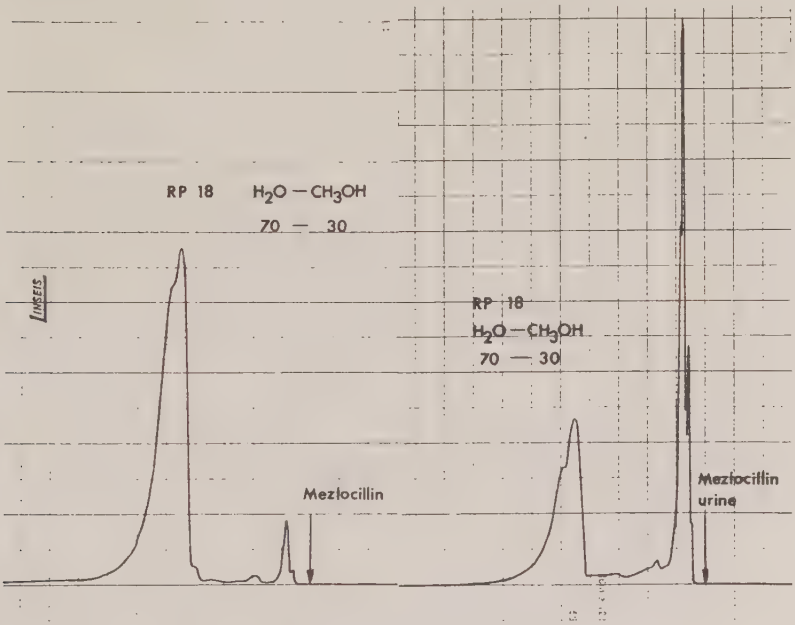


Abb. 48: a) 10 µl Mezlocillin (10 g/l)
b) 10 µl Vierstundenurin eines mit Mezlocillin (Baypen^{R}) behandelten Patienten.
Flußrate 4 ml/min, psi 190 µA, Photometerverstärkung 1/2, Papiervorschub 10 mm/min

Wie Abbildung 48 zu entnehmen ist, eignete sich dieses System auch besser für den Nachweis des Mezlocillin und Azlocillin im Urin. Abbildung 48 a zeigt das reine Mezlocillin und Abbildung 48 b die Vierstunden-Urinprobe eines mit Mezlocillin (Baypen^{R}) behandelten Patienten. Deutlich sieht man in der Abbildung 49, wie die Urinkonzentration des Azlocillin vom Zweistunden- bis zum Sechsstundenurin hin abnahm.

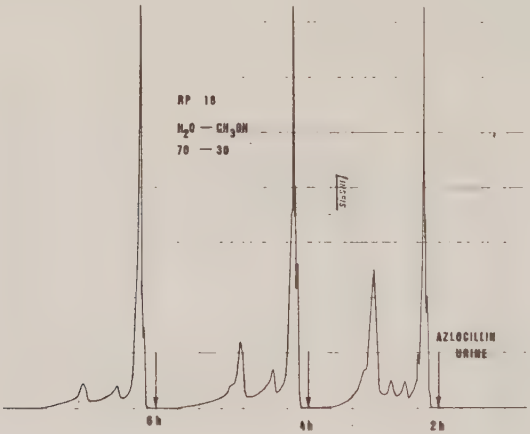


Abb. 49: Injiziert wurden jeweils 10 µl Urin eines Patienten, der mit 3 x 5 g Azlocillin (Securopen^{R}) und 3 x 80 mg Gentamicin (Refobacin^{R}) behandelt wurde.
Flußrate 4 ml/min
psi 190 µA
Photometerverstärkung 1/2
Papiervorschub 10 mm/min

Mit den bisher besprochenen Systemen war ein Nachweis des Carbenicillin und Ticarcillin im Urin nicht möglich, da beide Substanzen praktisch sofort aus der Säule eluiert wurden. Mit der gleichen Retentionszeit wurden aber alle Substanzen mit starkem Salzcharakter eluiert,

die ebenfalls bei 220 nm absorbierten. In weiteren Experimenten wurde also versucht, den unpolaren Charakter des Restmoleküls auszunutzen, indem der polare Anteil des Eluenten weiter erhöht wurde.
Das System Wasser-Methanol 80 : 20, das erst nach dem Gemisch 95 : 5 getestet wurde, brachte gegenüber letzterem keinen Vorteil. Erst bei der Zusammensetzung des Eluenten Wasser-Methanol 95 : 5 gelang im Urin der Nachweis von Carbenicillin und Ticarcillin. Beide Verbindungen lassen sich in 2 Komponenten aufspalten. Die Retentionszeit des Carbenicillin ist hierbei 2,5 und 3,0 Minuten, die des Ticarcillin 2,25 und 2,6 Minuten (Abb. 50).

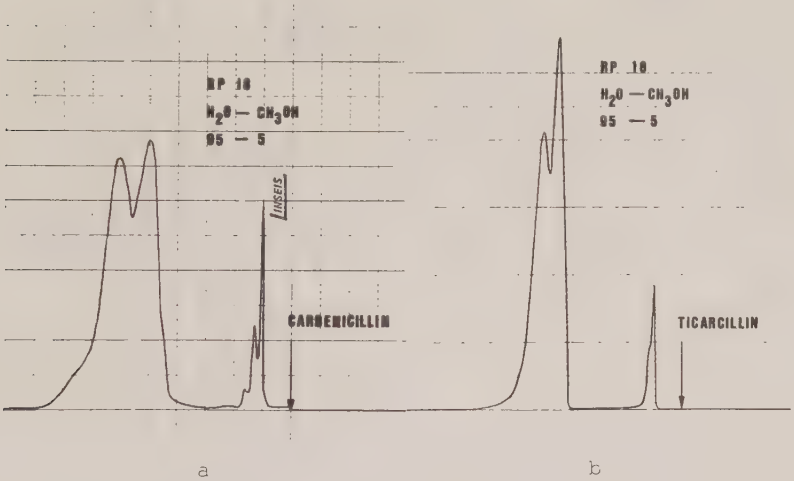
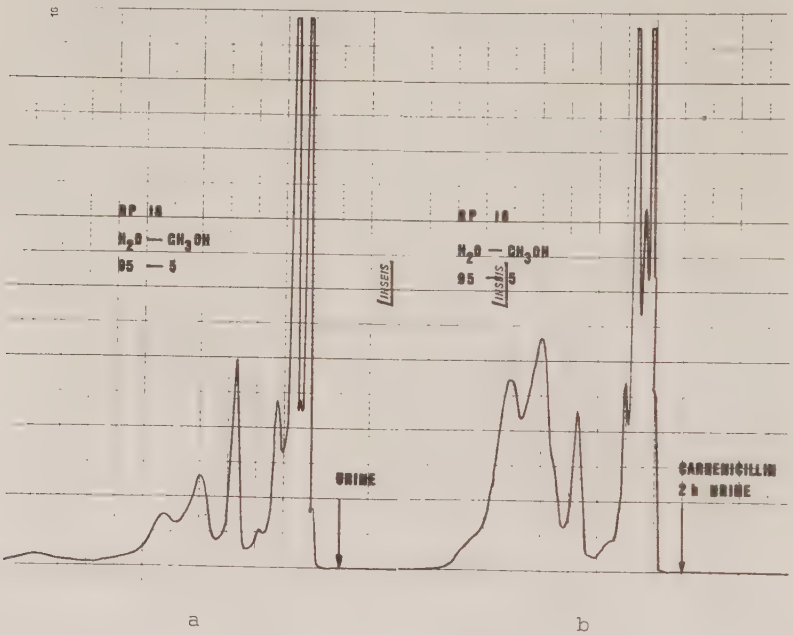


Abb. 50: a) 10 µl Carbenicillin (10 g/l)
b) 10 µl Ticarcillin (10 g/l)
Flußrate 4 ml/min
psi 160 µA
Photometerverstärkung 2
Papiervorschub 20 mm/min

Zwar stellte sich bei diesem Eluentengemisch der Urin nicht mehr als einzelner Peak dar (Abb. 51 a), doch ist die Zunahme der Absorption bei 2,5 und 3,0 Minuten deutlich gegenüber dem Leerurin des gleichen Patienten vor Therapiebeginn, so daß diese beiden Absorptionsmaxima eindeutig dem Carbenicillin zuzuordnen waren.



a b

Abb. 51: a) 10 µl Urin vor Therapiebeginn
b) 10 µl Zweistundenurin eines Patienten, der mit 2 x 5 g Carbenicillin (Anabactyl^{R}) und 2 x 30 mg Tobramycin (Gernebcin^{R}) behandelt wurde.
Flußrate 4 ml/min
psi 160 µA
Photometerverstärkung 1
Papiervorschub 20 mm/min

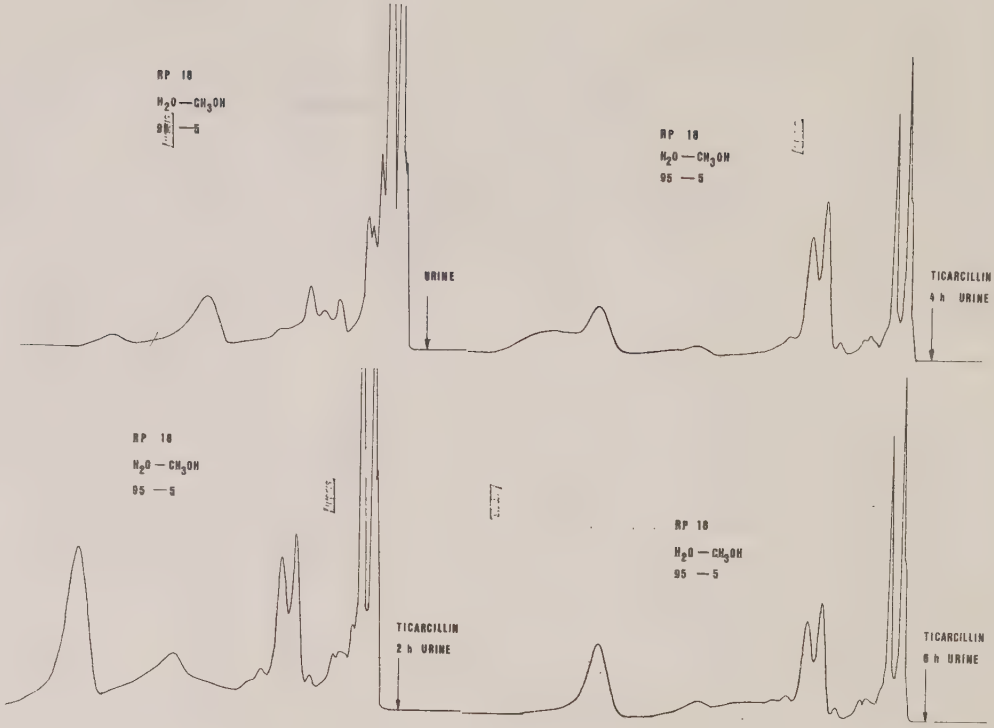


Abb. 52:

Nachweis des Ticarcillin im Zweistunden-, Vierstunden- und Sechsstundenurin.

a) 10 µl Leerurin

b) 5 µl Zweistundenurin

c) 5 µl Vierstundenurin

d) 5 µl Sechsstundenurin

Flußrate 40ml/min
psi 160 µA
Photometerverstärkung 1
Papiervorschub 20 mm/min

Das gleiche wurde für Ticarcillin festgestellt. Der Leerurin in Abbildung 52 a war eine Urinprobe aus dem Sammelurin am Tage vor Therapiebeginn. Der Patient war bereits mit 3 x 2 g Cefazolin (Grammaxin^{R}) behandelt worden. Zwei Stunden nach Therapiebeginn fand sich im Urin eine deutliche Extinktionszunahme bei 2,5 und 2,8 Minuten. Fast genauso hoch war sie noch im Vierstundenurin. Erst im Sechsstundenurin nahm die Ticarcillinkonzentration spürbar ab. Ob es sich bei den Peaks bei 5,5 und 7,7 Minuten um Cefazolin handelt, wurde nicht näher untersucht. Dies wäre durchaus möglich, da bei keinem anderen Patientenurin Peaks mit solchen Retentionszeiten auffielen.

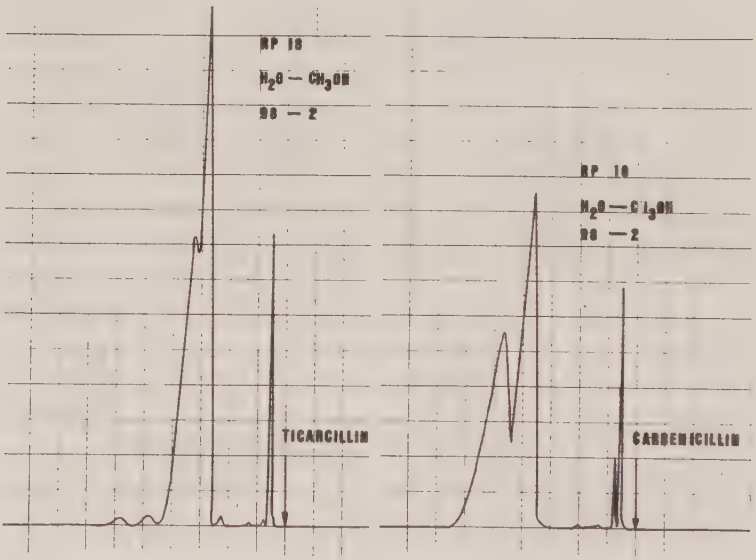


Abb. 53: Je 10 µl Ticarcillin beziehungsweise Carbenicillin (10 g/l) wurden eingespritzt.
Flußrate 3,5 ml/min
psi 120 µA
Photometerverstärkung 1/2
Papiervorschub 500 mm/h

Durch Erhöhung der wässrigen Phase auf 98 % beziehungsweise 100 % gelang schließlich die Trennung von Carbenicillin und Ticarcillin. Während die Retentionszeiten bei 98 % Wasser nur auf 3,3/3,9 Minuten für Ticarcillin und 4,2/5,5 Minuten für Carbenicillin anstiegen (Abb. 53), verdoppelten sich diese bei 100 % Wasser auf 7,5/8,8 Minuten für Ticarcillin und 9,4/12,0 Minuten für Carbenicillin (Abb. 54).

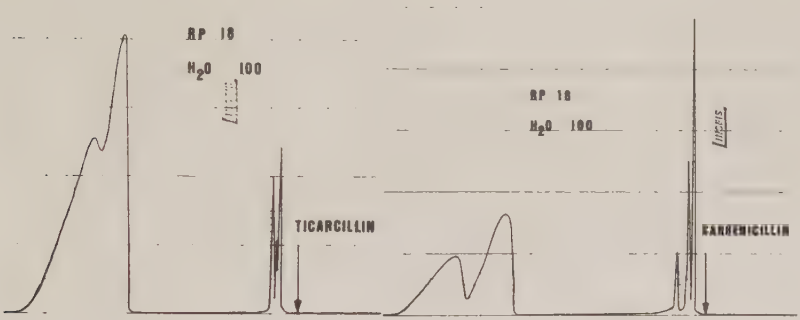


Abb. 54: Je 10 µl Ticarcillin beziehungsweise Carbenicillin (10 g/l) wurden eingespritzt.
Flußrate 3,5 ml/min
psi 120 µA
Photometerverstärkung 1/2
Papiervorschub 500 mm/h

Abschließend sind die Retentionszeiten der verschiedenen Substanzen in einer Tabelle zusammengestellt. Da neben der Eluentenzusammensetzung die Flußrate eine wichtige Variable darstellt, ist sie ebenfalls aufgeführt.

	Eluent	Flußrate in ml/min	Retentionszeiten in min				
RP 18	H_2O-CH_3OH		Ticar-cillin	Carbeni-cillin	Azlo-cillin	Mezlo-cillin	Peni-cillin G
	50 : 50	3,0	0,68	0,68	0,96	0,98	1,08
	60 : 40	4,0	0,60	0,60	1,08	1,24	-
	70 : 30	4,0	0,70	0,70	2,2/2,9	4,1	2,2
	80 : 20	4,0	0,84	0,84	-	-	-
	95 : 5	4,0	2,25/2,6	2,5/3,0	-	-	-
	98 : 2	3,5	3,3/3,9	4,2/5,5	-	-	-
	100 : 0	3,0	7,5/8,8	9,4/12,0	-	-	-
	90 : 10	2,0	2,8/3,0	3,15/3,5	-	-	-
SI 100	H_2O-CH_3OH	1,5	1,45	1,45	1,25	-	-
	25 : 75						
	CH_3OH-C_2H_5OH	4,0	1,9	2,15	1,3	1,1	-
	20 : 80						

Tab. 7: Aufgeführt sind die Retentionszeiten aller verwandten Substanzen in Abhängigkeit von Säule, Eluent und Flußrate.

3.5 Untersuchungen zum Nachweis und zur Auftrennung von Aminoglykosiden

Wie das UV-Spektrum von Gentamicin (Abb. 55) zeigt, besitzt diese Substanz ein Absorptionsmaximum bei 243 nm, so daß bei dieser Wellenlänge ein Nachweis möglich erscheint.

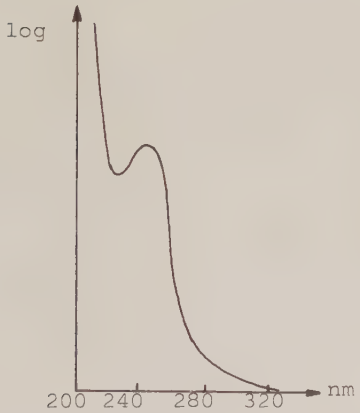


Abb. 55:
UV-Spektrum einer wässrigen Gentamicinlösung (40 g/l)

Die UV-Spektren der anderen Aminoglykoside zeigten hiervon keine besondere Abweichung.
Dieses Absorptionsmaximum ist relativ schwach, da Gentamicin keine Chromophore wie $>C=O$, $>C\lesssim^{O}_{OH}$ oder $>C=C<$ aufweist. Nur Sisomicin hat eine C-C Doppelbindung. Eluenten, die solche Chromophore in ihrem Molekül aufweisen, konnten daher nicht verwendet werden.
Da aus der Literatur keinerlei Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Untersuchungen über Aminoglykoside bekannt sind, wurde zuerst versucht, die Substanzen mit einer SI 100 Säule nachzuweisen.
Obwohl die möglichen Kombinationen von reinem Äthanol bis zu reinem Wasser untersucht wurden, gelang der Nachweis nicht. Da Aminoglykoside mehrere freie Aminogruppen aufweisen, wurde versucht, sie mit Kationenaustauschern nachzuweisen. Mit Wasser als Eluent gelang dieser Nachweis ebenfalls nicht. Der Zusatz von organischen Lö-

sungsmitteln erübrigte sich, da der Ionenaustausch durch organische Substanzen mehr oder weniger zurückgedrängt wird. Es blieb nur die Möglichkeit, bei einem pH <6-7 eine wirksame Protonierung der Aminogruppen zu erhalten. Da aber alle Puffer, die in Frage kamen, selbst bei der Wellenlänge des Gentamicin absorbierten und in wesentlich höherer Konzentration vorlagen, schien der Nachweis der Aminoglykoside mit den zur Verfügung stehenden Mitteln unmöglich.
Drei Möglichkeiten der Lösung seien jedoch angesprochen. Die erste ist außerordentlich aufwendig, für die anderen stand das notwendige Zusatzgerät nicht zur Verfügung.
1) Ein gebräuchlicher Nachweis von Aminozuckern in der Chemie ist die Derivatisierung mittels Borsäurekomplexierung. Diese Verbindungen absorbieren gut bereits im sichtbaren Licht und ermöglichen daher einen leichten Nachweis. Da aber die Retentionszeiten der reinen Substanzen interessieren, ist diese Komplexierung erst nach der Säule möglich. Dies wäre durch Fraktionierung mit anschließender Derivatisierung am einfachsten möglich. Auch eine laufende Komplexierung bereits vor dem Detektor ist technisch möglich, bedarf jedoch eines teuren Zusatzgeräts.
2) Nicht ganz so aufwendig ist der Ersatz der Ninhydrin-Reaktion durch den Einsatz von Fluram^{R} (Firma Roche). Diese Substanz gibt mit primären Aminen im sichtbaren Wellenlängenbereich stark fluoreszierende Verbindungen, deren Nachweis leicht zu führen ist (2,6). Dabei müßte jedoch der UV-Detektor durch einen Fluoreszens-Detektor ersetzt werden.
3) Als dritte Möglichkeit sei der sehr empfindliche Nachweis mittels Refraktometer genannt. Ein solches Gerät stand jedoch nicht zur Verfügung.

4 Zusammenfassung

4.1 Dünnschichtchromatographie der Aminoglykoside

Auf Kieselgelplatten gelang mit dem unmischbaren Fließmittelgemisch Chloroform-Methanol-17%iger Ammoniak 50 : 25 : 25 die Auftrennung des Gentamicin in sieben Komponenten, von denen drei antibiotisch aktiv waren. Die anderen Aminoglykoside Sisomicin, Tobramycin und Amikacin waren mit diesem Fließmittelgemisch jedoch nicht darstellbar, da die Substanzen fast ganz auf der Startlinie liegenblieben.
Mit dem Fließmittelgemisch Chloroform-Methanol-17%iger Ammoniak 12 : 50 : 38 ließen sich auf Kieselgelplatten alle Aminoglykoside durch unterschiedliche, deutlich abgrenzbare ninhydrinaktive Flecken nachweisen. Da von Kieselgelplatten ein antimikrobieller Nachweis mittels Bioautographie bei den erforderlichen Konzentrationen nicht möglich war, mußte dieser Nachweis mit Celluloseplatten geführt werden. Hierfür erwies sich dasselbe Fließmittel Chloroform-Methanol-17%iger Ammoniak 12 : 50 : 38 als geeignet. Die Rf-Werte der Aminoglykoside durch Nachweis mit Ninhydrin und mittels Bioautographie waren identisch und reproduzierbar.

4.2 Dünnschichtchromatographie der Penicilline

Mit dem Fließmittelgemisch n-Propanol-Äthanol-Essigsäureäthylester-Wasser 60 : 48 : 36 : 40 ließen sich Carbenicillin, Ticarcillin, Azlocillin und Mezlocillin auf Celluloseplatten gut nachweisen. Da die Verbindungen ninhydrinnegativ waren, kam nur ein Nachweis mit der Bioautographie in Frage. Mezlocillin war hierbei durch einen einzelnen Hemmhof sowohl in wässriger Lösung als auch im Urin nachzuweisen. Demgegenüber fanden sich bei

Carbenicillin und Ticarcillin immer zwei antibakteriell aktive Komponenten. Aufgrund der ähnlichen Molekülstruktur erwartete man annähernd gleiches Verhalten bei der Chromatographie, was durch Vergleich der Rf-Werte auch bestätigt wurde.
Sowohl die Unterscheidung der Aktivitäten mit der Bioautographie unter Verwendung von Pseudomonas aeruginosa Platten, als auch der Vergleich der Rf-Werte ergab, daß die schnell wandernde Komponente dem durch CO_2-Abspaltung entstandenen Penicillin G, beziehungsweise dem Penicillin G-Äquivalent mit einem Thiophen-Ring entsprach. Die langsam wandernde Komponente entsprach der eigentlichen Verbindung Carbenicillin oder Ticarcillin. Auch in Urin verhielten sich beide Substanzen ähnlich. Aufgrund der zwei Carbonsäuregruppen schienen beide Antibiotika im Dünnschichtchromatogramm etwas langsamer zu laufen als in reinen wässrigen Lösungen. Dieser Effekt wurde bei den durch CO_2-Abspaltung entstandenen Verbindungen nicht beobachtet.
Azlocillin bestand in wässriger Lösung aus drei biologisch aktiven Komponenten, während im Harn nur zwei aktive Substanzen gefunden wurden. Die mittelschnelle Komponente erwies sich in der Bioautographie mit Pseudomonas aeruginosa und Escherichia coli als Testorganismen als das eigentliche Azlocillin, da nur ein Hemmhof mit entsprechendem Rf-Wert gefunden wurde. In der Bioautographie mit Staphylococcus aureus erwies sich jedoch auch die langsamere Komponente als wirksam.

4.3 Hochdruckflüssigkeitschromatographische Untersuchungen der Penicilline

Nach einer theoretischen Betrachtung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurde versucht, die Penicilline Carbenicillin, Ticarcillin, Azlocillin und Mezlocillin mit einer polaren Säule (Lichrosorb SI 100)

aufzutrennen. Für eine Trennung erwies sich ein wasserfreier Eluent als notwendig (Äthanol-Methanol). Dieses Verfahren verbot sich für den Nachweis im Urin, weil durch das Wasser des Urins die Reproduzierbarkeit in Frage gestellt wurde.
Eine gute Auftrennung gelang jedoch mit einem reversed-phase-System (RP 18). Eine Eluentenzusammensetzung von 0,05%iger wässriger $(NH_4)_2CO_3$-Lösung - CH_3OH 70 : 30 erwies sich für die Auftrennung und den Nachweis des Azlocillin und Mezlocillin als genügend, während die sehr polaren Verbindungen Carbenicillin und Ticarcillin sofort mit einem großen Teil der adsorbierten Urinbestandteile eluiert wurden. Erst durch Erhöhung der wässrigen Phase auf 95 % wurde eine so starke Retention erreicht,daß beide Verbindungen aufgetrennt und im Harn nachgewiesen werden konnten. Azlocillin und Mezlocillin wurden bei dieser Eluentenzusammensetzung so stark retiniert, daß ein direkter Nachweis unmöglich wurde. Die Unterscheidung aller vier Antibiotika war somit ohne weiteres möglich.

4.4 Hochdruckflüssigkeitschromatographische Untersuchungen der Aminoglykoside

Die Auftrennung der Aminoglykoside mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie bereitete große Schwierigkeiten. Der Nachweis mittels Kationenaustauscher im sauren Medium scheiterte an der geringen Absorption der Aminoglykoside, da die Verbindungen keine Chromophore in ihrem Molekül aufweisen. Alle Puffer, die zur Anwendung kommen könnten, absorbierten selbst im gleichen UV-Bereich wie die Aminoglykoside und machten damit deren Nachweis unmöglich.

5. Literaturverzeichnis

1. ACRED,P., D.M.BROWN, E.T.KUNDSEN, G.N.ROBINSON, R.SUTHERLAND: New semisynth. penicillin active against pseudomonas pyocyanea. Nature 215, 25 (1967)

2. ADENFRIEND,S., S.STEIN, P.BÖHLEN, W.DAIRMAN, W.LEIM-GRUBER, M.WEIGELE: Fluorescamine: A Reagent for Assay of Amino acids, peptides, proteins, and Primary Amines in the Picomole Range. Science 178, 871 (1972)

3. ANDRASSY,K., E.RITZ, E.WEISSCHEDEL: Bleeding after carbenicillin administration. New Engl. J. Med. 1975, 109

4. ANTIBIOTIKA-FIBEL 4. Auflage Stuttgart: Thieme 1975

5. AUE,W.A., C.R.HASTINGS: Preparation and chromatographic uses of surface-bonded silicones. J. Chromatogr. 42, 319 (1969)

6. BENSON,J.R.: Durrum Resin Report No.6, 1973

7. BODEY,G.P.: Diskussionsbemerkung in: J. Infekt. Dis. Suppl.131, 127 (1973)

8. BODEY, G.P., RODRIGUEZ: Advances in the management of Pseudomonas aeruginosa infection in cancer patients. Europ. J. Cancer 2, 435 (1973)

9. BRUST,O.E., I.SEBESTIAN, I.HALASZ:
Stationäre Phasen mit Si-N= Bindung für die Flüssigkeitschromatographie.
J. Chromatogr. 83, 15 (1973)

10. CARROLL,M.A., E.R.WHITE, Z.JANCSIK, J.E.ZAREMBO:
The determination of cephradine und cephalexin by reverse phase high-performance liquid chromatography.
Journal of antibiotics 30, 397 - 403 (1977)

11. DARK,W.A., R.J.LIMPERT:
An Evaluation of Available Packings for GPC.
J. Chromatogr. Sci. 11, 114 (1973)

12. ENGELHARDT,H.: Hochdruckflüssigkeitschromatographie.
2. Aufl. Berlin Heidelberg New York:
Springer 1977

13. FRANKLIN,M.A.: Pseudomonas. Ein bakteriologisches Profil.
Dtsch. Berarb. R.Wittke, Mainz 1973

14. GOUW,T.H.: Guide to Modern Methods of Instrumental Analysis.
Wiley Interscience, New York 1972

15. HADDEN,N., F.BAUMANN, et al.: Basic Liquid Chromat.
Varian Aerograph.(1971)

16. HALASZ,I., I.SEBESTIAN:
Neue stationäre Phase für die Chromatographie.
Angew. Chemie 81, 464 (1969)

17. HASTINGS,C.R., W.A.AUE, I.M.AÜGL:
Surface-bonded Silicones from volatile Monomers for chromatography.
J. Chromatogr. 53, 487 (1970)

18. HORVATH,C., W.MELANDER, I.MOLNAR:
Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases.
J. Chromatogr. 125, 129 (1976)

19. HORVATH,C., W.MELANDER, I.MOLNAR:
Liquid Chromatography of Ionogeme Substances with Nonpolar Stationary Phases.
Anal. Chem. 49, 142 (1977)

20. HOWARD,G.A., A.J.P.MARTIN:
The Separation of the C_{12}-C_{18} Fatty Acids by Reversed-phase Partition Chromatography.
Biochem. J. 46, 215 (1951)

21. IZMAILOV,N.A., M.S.SCHRAIBER:
Tropfenchemische Analysenmethoden und Anwendung in der Pharmazie.
Farmatzija 3, 1 Moskau (1938)

22. KARGER,B.L., J.R.GANT, A.HARTKOPF, P.H.WEINER:
Hydrophobic effects in reversed-phase liquid chromatography.
J. Chromatogr. 128, 65 (1976)

23. KIM,S.M.: Zur Problematik der Penicillintrennung mit Hilfe der HPLC.
Aus dem analytischen Labor der pharmazeutischen Entwicklungsabteilung der Firma Chemie Grünenthal GmbH Stolberg/Rhld.
(unveröffentlicht)

24. KIRKLAND,J.J. (Ed.): Modern Practice of Liquid Chromatography.
Wiley Interscience, New York (1971)

25. KIRKLAND,J.J., E.J.DU PONT DE NEMOURS & CO:
High Speed Liquid Partition Chromatography With Chemically Bonded Organic Stationary Phases.
J. Chromatogr. Sci. 9, 206 (1971)

26. KIRKLAND,J.J., J.J.DE STEFANO:
Controlled Surface Porosity Supports with Chemically-Bonded Organic Stationary Phases for Gas and Liquid Chromatography.
J. Chromatogr. Sci. 8, 309 (1970)

27. LEITCH,R.E., J.J.DE STEFANO:
Column Packings for Modern Liquid Chromatography.
J. Chromatogr. Sci. 11, 105 (1973)

28. LOCKE,D.C.: Chemically Bonded Stationary Phases for Liquid Chromatography.
J. Chromatogr. Sci. 11, 130 (1973)

29. MAEHR,H., C.SCHAFFNER: The separation and differentiation of the gentamicin-complex.
J. Chromatogr. 30, 572 - 578 (1967)

30. MAJORS,R.E.: High performance liquid chromatography packing materials.
American Laboratory(1972),27 - 39
International Laboratory Nov./Dec. (1975)

31. MAY,W., H.BUCHARDI, W.KILLIAN:
Epidemiologische Studie zum Problem des Pseudomonas-Hospitalismus.
Münch, med. Wschr. 116, 97 (1974)

32. MC LAUGHLIN,J.E., D.S.REEVES:
Clinical and laboratory evidence for inactivation of gentamicin by carbenicillin.
Lancet 1971 I, 261 (1971)

33. NAUMANN,P.: Neue Entwicklungen auf dem Gebiet der Antibiotikatherapie.
Internist 16, 407 - 415 (1975)

34. NEUSSEL,H.G.: Kombinationswirkung von Carbenicillin und Gentamicin auf Bacterium pyocyaneum.
Int. Z. klin. Pharmakol. Ther. Toxikol 3, 3 (1969)

35. NEUSSEL,H.G., LINZENMEIER:
A new semi-defined medium for antibiotic sensitivity testing.
Procs. VIIIth Int. Congr. Chemother. Athen 1973, Athen (1974)

36. PERRY,S.G., R.AMOS, P.J.BREWER:
Practical Liquid Chromatography.
New York - London: Plenum Press (1972)

37. ROBINSON,G.N., R.SUTHERLAND:
Semisynthetic penicillins.
Adv. Pharmacol. Chemother. 11, 151 (1973)

38. SABATH,L.D., J.I.CASEY, P.A.RUCH, L.L.STUMPF, M.FINLAND: Rapid microassay of gentamicin, kanamycin, neomicin, streptomycin, and vancimycin in serum or plasma.
J. Lab. clin. Med. 78, 457 - 463 (1971)

39. SCHORN,P.J.: Dünnschichtchromatographie hydrophiler Pflanzeninhaltsstoffe unter besonderer Berücksichtigung der Phloroglucinbutanone des Dryopteris filix-mas (I/Schott).
Dissertation, Saarbrücken(1963)

40. SIMON,C., M.LEUTH, V.MALERCZYK:
Ticarcillin: In-vitro-Aktivität und Pharmakokinetik.
Dtsch. med. Wschr. 99, 2460 (1974)

41. STAHL,E.: Dünnschichtchromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch.
2. Aufl. Berlin Heidelberg New York: Springer 1967

42. SYNDER,L.R.: Principles of Adsorption Chromatography.
New York: Dekker 1968

43. SYNDER,L.R., J.J.KIRKLAND:
Modern Liquid Chromatography.
American Chemical Society Short Courses
1971

44. ULLMANN,U.: In vitro-Untersuchungen über die Wirksamkeit der Kombination von Gentamicin und ß-Lactamantibiotika auf Pseudomonas aeruginosa.
Immunität und Infektion 3 Nr.2, 79 - 85 (1975)

45. ULLMANN,U.: Antibacterial Activity of Ticarcillin, Tobramycin and Gentamicin alone and in Combination against Pseudomonas aeruginosa in vitro.
Chemotherapy 23, 314 - 323 (1977)

46. ULLMANN,U.: Untersuchungen des Wirkkomplexes Gentamicinsulfat mit der Dünnschicht- und Molekularsiebchromatographie.
Drug. Res. 21, 263 - 267 (1971)

47. WAGMANN,G.H., J.A.MARQUEZ, M.J.WEINSTEIN: Chromatographic separation of the components of the gentamicin complex.
J. Chromatogr. 34, 210 - 215 (1968)

48. WARREN,E., R.J.SNYDER, J.A.WASHINGTON: Four-hour microbiological assay of gentamicin in serum.
Antimicrob. Agents and Chemother. 1, 46 - 48 (1972)

Mein Lebenslauf

Am 7. September 1948 wurde ich, Wilhelm Wurst, in Herrenberg als Sohn des Stefan Wurst und seiner Ehefrau Anna, geb. Feth, geboren.

Von 1955 bis 1959 besuchte ich die Grundschule in Herrenberg. Ebenfalls in meiner Heimatstadt ging ich ab 1959 in das mathematisch-naturwissenschaftliche Schickhardt-Gymnasium, dessen Besuch ich am 21. Juni 1967 mit der Reifeprüfung abschloß.

Vom Oktober 1967 bis zum März 1969 leistete ich in Böblingen und Calw den Grundwehrdienst bei der Bundeswehr ab.

Mit dem Sommersemester 1969 begann ich das Studium der Chemie an der Universität Tübingen, das ich im März 1975 mit der Erlangung des akademischen Grades eines Diplom-Chemikers abschloß. Während der Diplomarbeit befaßte ich mich mit dem TRH, seinen Derivaten und der Bestimmung ihrer biologischen Aktivitäten mit dem Radioimmunassay.

Das Studium der Medizin nahm ich im Sommersemester 1972 auf. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung bestand ich am 22. März 1973, das Physikum am 5. September 1974. Am 30. März 1976 und im August 1977 folgten der erste und der zweite Abschnitt der ärztlichen Prüfung.
Den dritten Teil der ärztlichen Prüfung habe ich am 20. Oktober 1978 mit Erfolg abgeschlossen.

Seit 10. Mai 1974 bin ich mit Elke Wurst, geb. Kirsamer verheiratet.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. BADER für die Zurverfügungstellung eines Arbeitsplatzes im Hygiene-Institut danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. ULLMANN für die Überlassung des Themas und für die jederzeit freundliche Beratung und Unterstützung.

Druck und Gesamtherstellung:

Bölk & Schulz · Kopier- und Drucktechnik
Bismarckstr. 92
7400 Tübingen · Tel. 07071/32321